TRICHOTOXIN A — 40: ISOLIERUNG, SEQUENZIERUNG UND KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN EINES MEMBRANMODIFIZIERENDEN POLYPEPTID — ANTIBIOTIKUMS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans Brückner
aus Göppingen

1979

TRICHOTOXIN A — 40: ISOLIERUNG, SEQUENZIERUNG UND KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN EINES MEMBRANMODIFIZIERENDEN POLYPEPTID — ANTIBIOTIKUMS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans Brückner
aus Göppingen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 1979

Dekan:	Professor Dr. Michael Hanack
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Günther Jung
2. Berichterstatter:	Professor Dr. Ernst Bayer

Herrn Prof. Dr. Günther Jung
gebührt mein herzlicher Dank für die großzügige Förderung dieser Arbeit, die zahlreichen Diskussionen sowie die vielen wertvollen Anregungen und Ratschläge.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0006

Inhaltsverzeichnis

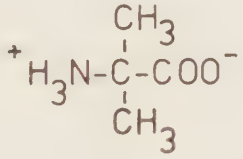
1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1.	Antibiotische Aktivitäten von Trichotoxin und verwandten Peptidantibiotika	6
1.2.	Weitere biologische Aktivitäten von Trichotoxin, Alamethicin und Suzukacillin	7
1.3.	Biosynthese und Mikroheterogenität	8
1.4.	Problemstellung	9
2.	Kultur von Trichoderma viride NRRL 5242, Isolierung und Trennung von Trichotoxin A-40 und A-50	10
3.	Charakterisierung von Trichotoxin A-40, Bestimmung des N- und C-Terminus	15
3.1.	Identifizierung der Aminosäuren	15
3.1.1.	Qualitative Aminosäureanalyse durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie	15
3.1.2.	Quantitative Aminosäureanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie	17
3.1.3.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	20
3.2.	Konfiguration der Aminosäuren	22
3.2.1.	Konfigurationszuordnung und Methoden zu Racemattrennung des Isovalin	25
3.2.2.	Gaschromatographische Bestimmung der R-Konfiguration des Isovalin in Trichotoxin A-40	27
3.2.3.	Bestimmung der R-Konfiguration des Isovalin in den verwandten Peptidantibiotika Trichotoxin A-50, Antiamoebin, Stilbellin, Samarosporin (Emerimicin IV) sowie Suzukacillin A und B	28
3.3.	Methoden zum Nachweis von Ac-Aib-OH in Trichotoxin, Alamethicin und Suzukacillin; Ac-Iva-OH als Bestandteil von Suzukacillin B	32
3.3.1.	Dünnschichtchromatographischer Nachweis	33

3.3.2.	Säulenchromatographische Isolierung von Ac-Aib-OH	35
3.3.3.	Isolierung von Ac-Aib-OMe durch Sublimation des Methylesters	35
3.3.4.	Nachweis von Ac-Aib-OH und Ac-Iva-OH durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie	36
3.4.	Bestimmung der Position der Glutaminsäure und des Glutamin sowie der α-Verknüpfung des Valinol im Trichotoxin A-40	44
4.	Sequenzierung	51
4.1.	Sequenzierungsstrategie	51
4.2.	Säurelabilität des Trichotoxin	52
4.2.1.	Selektive Trifluoracetolyse von Trichotoxin A-40	54
4.2.2.	Acidolytische Spaltung von Modellpeptiden	58
4.2.2.1.	Trifluoracetolyse von Ac-Aib-Pro-NH_2	58
4.2.2.2.	Trifluoracetolyse von Ac-Aib-Ala-OH, Ac-Aib-Gly-OH und Ac-Ala-Aib-OMe	62
4.2.2.3.	Selektive Abspaltung des Valinol von Modellpeptiden und von isolierten N-Prolyl-peptiden des Trichotoxin A-40	66
4.3.	Isolierung von Partialsequenzen nach Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40	71
4.4.	Sequenzierung isolierter Fragmente aus Trichotoxin A-40 durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie	79
4.5.	Edman-Abbau an fester Phase von α-Aminoisobutyryl-Modellpeptiden und Partialsequenzen des Trichotoxin A-40	89
5.	Konformationsuntersuchungen und membranmodifizierende Wirkungen	95
5.1.	Circulardichroismus	95

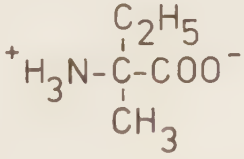
5.2.	^{13}C-NMR-Untersuchungen an Trichotoxin A-40, daraus isolierten Partialsequenzen und Modellpeptiden	100
5.2.1.	^{13}C-NMR-Signale N-acetylierter Peptide und von N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure	103
5.2.2.	^{13}C-NMR-Signale von Valinol und Derivaten sowie Isovalin	108
5.2.3.	^{13}C-NMR-Signale von Trichotoxin A-40 und Partialsequenzen	114
5.3.	Membranmodifizierende Wirkungen	131
5.3.1.	Hämolytische Eigenschaften von Trichotoxin A-40, Derivaten und Partialsequenzen	131
5.3.2.	Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichtmembranen	136
6.	Sekundärstruktur und Aktivität	145
7.	Experimenteller Teil	149
7.1.	Isolierung von Trichotoxin A-40 aus Trichoderma viride NRRL 5242	149
7.2.	Aminosäureanalysen	153
7.3.	Dünnschichtchromatographie	154
7.4.	Kieselgel-Säulenchromatographie	156
7.5.	Acidolyse von Trichotoxin A-40 und Isolierung von Partialsequenzen	157
7.6.	Derivate des Trichotoxin A-40	183
7.7.	Synthese von Aminosäurederivaten und Peptiden	184
7.8.	Hämolyse	188
8.	Zusammenfassung	190
9.	Literaturverzeichnis	193

1. Einleitung und Problemstellung

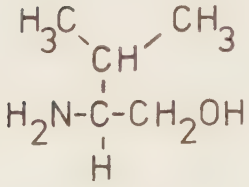
Seit 1960[+] wird über die Isolierung lipophiler Polypeptidantibiotika aus Mikroorganismen der Klasse Ascomycetes-Deuteromycetes (Trichoderma spp., Emericellopsis spp., Stilbella sp., Cephalosporium sp. und Samarospora sp.) berichtet. Neben der Anwesenheit von proteinogenen Aminosäuren zeichnen sich diese Peptide durch einen hohen Gehalt der als Metaboliten ansonsten selten vorkommenden α-Aminoisobuttersäure (2-Methylalanin) aus. Ferner enthalten sie zum Teil Isovalin (2-Ethylalanin) sowie einen Aminoalkohol (Phenylalaninol oder Valinol).



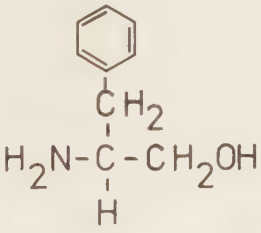
α-Aminoisobuttersäure



Isovalin



Valinol



Phenylalaninol

[+]Angegeben wird das Jahr der Publikation in wiss. Zeitschriften, nicht Patentanmeldungen.

Zu diesen Polypeptidantibiotika zählen in der Reihenfolge ihrer Beschreibung[+]:

Suzukacillin A und B (1966) (1-6)
Alamethicin (1967) (7-18)
Antiamoebin I und II (1967) (19-28)
Stilbellin (1971) (29)
Trichotoxin A und B (1972) (30)
Emerimicin II, III u. IV (1974) (31,32)
Zervamicin I und II (1974) (33)
Samarosporin (1976) (34,35)
Trichotoxin A-40 und A-50 (1977) (36-43)

Mueller und Rudin (44) berichteten 1968 erstmals, daß Alamethicin in künstlichen Lipid-Doppelschichten-Membranen einen charakteristischen, spannungsabhängigen Ionenleitwert hervorrufen kann, sowie vom Auftreten von Aktionspotentialen, die denen an Nervenaxonen beobachteten vergleichbar sind. Aufgrund dieser Ergebnisse stieg das Interesse an Peptiden dieser Verbindungsklasse außerordentlich. Suzukacillin (45) und Trichotoxin A-40 (46) zeigen ähnliche Eigenschaften. Wesentlich ist, daß die Ionentransportphänomene hierbei nicht nach einem Carriermechanismus wie bei Valinomycin (47) oder über Kanalbildungen wie bei Gramicidin A (48) erfolgen, sondern durch Bildung hydrophiler Aggregate variablen Durchmessers, sog. Poren (49); vergl. dazu Abschn. 5.3.2.

[+]Aib-haltige Peptidantibiotika, die in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt wurden, sind I.C.I. No. 13959 (50) und Chlamydocin (51), ein aus Diheterospora Chlamydosporia gewonnenes cyclisches Tetrapeptid, welches neben Aib, Phe und Pro die ungewöhnliche Aminosäure L-2-Amino-9,10-epoxy-8-oxodecansäure enthält.

Emerimicin III (IV)

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15
Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Ala-Phol
                                                    (Aib)
```

Antiamoebin I (II)

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16
Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Phol
                                      (Pro)
```

Alamethicin I (II)

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol
                    (Aib)
```

Suzukacillin A

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19
Ac-Aib-Pro-Val-Aib-Val-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-

                                                        20  21  22  23  24
                                                    -Aib-Aib-Glu-Gln-Phol
```

Trichotoxin A-40

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18
Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol
      (Ala)                         (Ala)                     (Aib)
```

Abb. 1. Reihenfolge der Aminosäuren in Polypeptidantibiotika welche α-Dialkyl-α-aminosäuren sowie einen Aminoalkohol enthalten

Tab. 1 Übersicht über amphiphile, α-Dialkyl-α-aminosäuren enthaltende Polypeptidantibiotika

Name	Mikroorganismus und Bezugsquelle	Antibiotikum im Kulturfiltrat (K), Mycel (My)	Vorkommen	Lit.
Suzukacillin A und B	Trichoderma viride PERS EX. FR. Strain 63Cl, (Asahi Chemical Industrial Co., Ltd., Tokyo)	K	Erde	(1)
Alamethicin	Trichoderma viride PERS EX. FR. Antibioticum U-22 324 (The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA) NRRL 3199	K	-.-.-	(7)
Antiamoebin I und II	Emericellopsis poonensi THIRUM. E. synnematicola MATHUR u. THIRUM. Cephalosporium pimprina THIRUM. (Hindustan Antibiotics Ltd., Pimpri)	K (20%) My (80%)	Erde	(22)
Stilbellin	Stilbella sp. (Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan	My	Hirschdung (deer dung)	(29)
Trichotoxin A	Trichoderma viride PERS EX. FR. NRRL 5242	My	Mais (Texas (T) male -sterile corn)	(30)
Trichotoxin B	Trichoderma viride PERS EX. FR. NRRL 5243	My	analog Trichotoxin A	(30)

Trichotoxin A-40 u. A-50	Trichoderma viride PERS EX. FR. NRRL 5242	My	Mais, vergl. Trichotoxin A u. B	(37)
Emerimicin II-IV (auch als Antibiotika EM-2(U-40588) EM-3(U-40589) EM-4(U-40590) bekannt	Emericellopsis microspora (Zusatz von trans-4-n-Propyl-L-prolin zum Nährmedium) Strain 333, (The Upjohn Company, Kalamazoo, Mich., USA)	My	-.-.-	(31)
Zervamicin I u. II (auch als Zervacin I u. II bekannt	Emericellopsis salmosynnemata Strain 336 (The Upjohn Company, Kalamazoo, Mich., USA)	My	-.-.-	(33)
Samarosporin	Samarospora sp. No. F-7762 (Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Tokyo) FERM-P 224	My	Erde	(34)
Tü 165	Em. salmosynnemata (CBS 382.62)+			(28)

NRRL = U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Sevice, Northern Utilitation Research and Development Division, Peoria, Ill. 61604, IMI = Commonwealth Mycological Institute, FERM = Fermentation Research Institute, Chiba (Japan), CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland

+CBS 382.62 wird vom Institut für Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter der Bezeichnung Tü 165 kultiviert. Das daraus gewonnene Peptidantibiotikum ist identisch mit Antiamoebin und wird in vorliegender Arbeit mit den Nummern der Stämme bezeichnet.

1.1. Antibiotische Aktivitäten von Trichotoxin und verwandten Peptidantibiotika

Von Suzukacillin wird eine antibakterielle Wirkung gegenüber Bacillus subtilis, Xanthomonas oryzae, Sarcina lutea, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Corynebacterium diphtheriae und Mycobacterium phlei sowie eine antifungische gegen Aspergillus niger, Trichophyton fumigatus und Saccharomyces sake berichtet (Konzentration 10 - 100 µg/ml) (1). Patentiert wurde die Verwendung gegen Kokzidiose, einer Darmerkrankung bei Tieren (6). An Antiamoebin interessant ist vorwiegend eine in vitro und in vivo festgestellte protozoide und antihelminthische Wirkung (auch beim Menschen) (22). Bei oraler Behandlung ist es aktiv gegen Dracunculus medinensis (22). Im Tierversuch wurden Wirkungen gegen Trypanosoma evansii festgestellt. Der Erreger wird bei einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht des Versuchstieres vollständig abgetötet, während die LD-50 bei 155-165 mg/kg liegt (22). Die in vitro Aktivität gegen Trichomonas vaginalis beträgt 2-4 µg/ml (22). Gegen Pilze wurde nur eine schwache Aktivität bei relativ hohen Konzentrationen ermittelt. Stilbellin zeigt eine minimale Hemmkonzentration von 20 µg/ml gegen Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus, von 50 µg/ml gegen Escherichia coli sowie Klebsiella pneumoniae und von 50 µg/ml gegen Trichomonas vaginalis (29). Ermerimicin II-IV zeigt keine signifikante in vitro antifungische Wirkung aber in vitro Aktivität in Konzentrationen von 50 - 100 µg/ml gegen Protozoen wie Ochromonas danica, Crythidia fasciculata und Tetrahymena pyriformis (31). Zervamycin I u. II zeigen vorwiegend eine Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien, wobei II etwas aktiver ist als I, und keine signifikante antifungische Aktivitäten. In vitro ist eine Aktivität gegen Protozoen vorhanden. Zervamicin II ist aktiv gegen Crithidia fasciculata (50 µg/ml) und Tetrahymena pyriformis (25 µg/ml). Zervamicin I besitzt keine Aktivität gegen Crithidia fasciculata (200 µg/ml) und O. danica, aber gegen T. pyriformis (100 µg/ml) (33). Samarosporin zeigt eine

geringe Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Hefen, Pilze und Protozoen (34). Pharmakologisch interessant ist eine antiphlogistische Wirkung (35). Von 14 in vitro untersuchten pathogenen Pilzen hemmt Alamethicin in einer Konzentration von 100 µg/ml Blastomyces dermatitis und in zehnmal höherer Konzentration Nocardia asteroides, Hormodendrum compactum u. a.. Gegen Bakterien wie z. B. E. coli, P. vulgaris und S. typhosa beträgt die minimale Hemmkonzentration >1000 µg/ml, gegen S. viridans 31 µg/ml (7). Bei vergleichenden Untersuchungen von Trichotoxin A-40, Alamethicin F-50 und Suzukacillin A (16) sowie Trichotoxin A-50 (39) im Plattendiffusionstest wurden annähernd gleichgroße Hemmhofdurchmesser erhalten ($2x10^{-3}$ mol/l) gegen Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus und Saccharomyces cerevisiae. Bemerkenswert war der Befund, daß bei Mycoplasma laidlawii (ein Bakterium ohne eine die eigentliche Plasmamembran schützende Zellwand) keinerlei Wachstumshemmung durch die letztgenannten Polypeptid-Antibiotika festgestellt wurde (16).

1.2. Weitere biologische Aktivitäten von Trichotoxin, Alamethicin und Suzukacillin

Neben den vorerwähnten antibiotischen Eigenschaften und der Erzeugung von Aktionspotentialen an Lipidmembranen seien noch eine Reihe weiterer membranmodifizierender Eigenschaften obiger Peptidantibiotika erwähnt, die zum Teil nur an Alamethicin untersucht worden sind. Es sind dies die hämolytische Wirkung auf Human- und Tier-Erythrozyten (14-16, 37, 39, 52, 53), lytische Aktivität gegenüber Mäuse-Lymphozyten und Ratten-Mastzellen (16), Fusion von Lecithin-Vesikeln (54), detergentienähnliche Effekte auf die Plasmamembran von Lymphozyten (55), Wechselwirkung mit Rinder-, Ratten- und Mäuse-Leukozyten (56), Hemmung der DNS-Synthese in Lymphozyten (16, 57), Erhöhung der Permeabilität von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (14, 53), Stimulierung der Aktivität von Adenylat-Cyclase und (Na^+, K^+)-ATPase in Herz Sarcolemma Vesiceln (58). Großes

Interesse fanden insbesondere die Beobachtungen, daß Alamethicin eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung an Mitochondrien (57) und eine Stimulation des Ionentransportes durch Mitochondrien-Membranen (59) bewirkt.

1.3. Biosynthese und Mikroheterogenität

Wie viele andere Antibiotika zeichnen sich auch die erwähnten Peptidantibiotika durch eine Mikroheterogenität aus (vergl. Abb. 1), die sich durch einen Austausch und teilweise auch durch Insertion von Aminosäuren bemerkbar macht. Bei Alamethicin wurde gezeigt, daß sich schon dünnschichtchromatographisch vier Komponenten unterscheiden lassen, wovon zwei durch Glu/Gln Austausch bedingt sind (60). Bei der Sequenzierung von Alamethicin (10) wurde ein Aib/Ala Austausch festgestellt. In der Rohware des Suzukacillins und bei isoliertem Alamethicin (in unserem Arbeitskreis) konnte in beiden Fällen durch HPLC etwa 6 Komponenten festgestellt werden (16). Suzukacillin B weist eine Komponente mit Austausch von N-terminalem Ac-Aib-OH gegen Ac-Iva-OH auf; vergl. 3.3. und (61). Trichotoxin A-40 und A-50 unterscheiden sich u. a. durch Glu/Gln Austausch, Trichotoxin A-50 zeigt bei multiplikativen Gegenstromverteilungen ebenfalls noch eine starke Mikroheterogenität (62). Für Trichotoxin A-40 konnte in der vorliegenden Arbeit ein Gly/Ala, Aib/Ala und Iva/Aib Austausch nachgewiesen werden. Antiamoebin I unterscheidet sich von Emerimicin IV bei gleichzeitigem Val/Iva Austausch durch Insertion von Prolin (26); vergl. hierzu auch die Sequenzen in Abb. 1. Grund für diese ausgeprägte, die Reindarstellung und Sequenzierung dieser Peptidantibiotika sehr erschwerende Mikroheterogenität ist die nach einem nichtribosomalen Mechanismus erfolgende Biosynthese an Multi-Enzym-Komplexen mit verringerter Spezifität (63-68).

1.4. Problemstellung

Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation ist die Sequenzierung des Polypeptidantibiotikums Trichotoxin A-40. Zur Gewinnung der dazu erforderlichen Mengen an Peptid sollte dessen Isolierung aus dem Mycelium des Fadenpilzes Trichoderma viride NRRL 5242 optimiert und eine Methode zur Trennung und Reindarstellung größerer Mengen der Hauptkomponenten Trichotoxin A-40 und A-50 ausgearbeitet werden.
Weitere Fragestellungen und Untersuchungen ergaben sich durch die im Verlaufe der Sequenzierung entwickelten Methoden und Erkenntnisse. Die Isolierung von reinem Trichotoxin A-40 im Grammaßstab erlaubte z. B. Untersuchungen durch temperaturabhängige ^{13}C-NMR-Spektroskopie, chemische Derivatisierung des Peptids und Untersuchungen der Derivate auf ihre konformativen, hämolytischen und membranporenbildenden Eigenschaften. Durch die Entwicklung selektiver acidolytischer Spaltmethoden war die Möglichkeit zur Isolierung definierter Partialsequenzen in ausreichender Menge für Sequenzierungsversuche (GC/MS, Edman-Abbau an fester Phase, Endgruppenbestimmung) sowie ^{13}C-NMR - Untersuchungen, CD-Messungen, Ermittlung hämolytischer und membranporenbildender Aktivitäten und chemisch-kinetischen Untersuchungen gegeben. Diese selektive acidolytische Trichotoxinspaltung sollte an synthetischen Modellverbindungen nachvollzogen werden. Methoden zur Bestimmung des acylierten N-Terminus sowie der Konfiguration der Aminosäuren sollten vom Trichotoxin auf strukturell ähnliche Aib-haltige Peptidantibiotika übertragen werden. Membranmodifizierende Eigenschaften wurden bislang vom Alamethicin (44), Suzukacillin (45) und Trichotoxin (46) berichtet. Von ersterem wurde bisher nur eine vorläufige Sequenz angegeben (5), da sich bei der GC/MS-Analyse des Partialhydrolysates Schwierigkeiten durch nicht abtrennbare Analoge ergaben. Die Sequenzen der Hauptkomponenten von Alamethicin dürften sich nach unabhängigen Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen nicht mehr wesentlich ändern. Trichotoxin A-40 zeigt ein dem Alamethicin und Suzukacillin zwar ähnliches, aber charakteristisch

differenziertes Verhalten bei Experimenten an künstlichen Lipidmembranen sowie an biologischen Systemen. Daher war anzunehmen, daß sich bei bekannter Primärstruktur und Konformation auch dieses Peptids die Modellvorstellungen für den Transport von Ionen und Molekülen durch Membrane und speziell für Nervenreizleitung sinnvoll erweitert werden könnten.

2. Kultur von Trichoderma viride NRRL 5242, Isolierung und Trennung von Trichotoxin A-40 und A-50

Die Zucht von Trichoderma viride NRRL 5242 erfolgte in enger Anlehnung an die Vorschrift von Irmscher (16, 37) in Standkultur, um identisches Trichotoxin zu erhalten (vergl. exp. Teil).
Die Aufarbeitung des Pilzmycels wurde geändert, um die Ausbeute an Peptidantibiotikum zu optimieren. Ebenso wurde die dünnschichtchromatographische Trennung der Komponenten Trichotoxin A-40 und A-50 durch eine multiplikative Gegenstromverteilung (Craig-Verteilung) (69, 70) ersetzt. Neben der Trennung erfolgte hierbei zugleich eine weitergehende Reinigung durch Abtrennung nichtpeptidischer, lipophiler Bestandteile. Die Extraktion des aus überwiegend apolaren Aminosäuren bestehenden Peptidantibiotikums erfolgte durch schonende Soxhlet-Extraktion mit dem niedrig siedenden Dichlormethan. Die Methode hat den Vorteil, daß das Peptid praktisch quantitativ aus dem lyophilisierten Pilzmycel gelöst wird und die Extraktion dabei selbsttätig verläuft. Die anschließende Säulenchromatographie in methanolischer Phase an Sephadex LH-20 hatte sich zur Abtrennung von Lipiden, Farbstoffen und nichthämolytischen Peptiden bewährt und wurde beibehalten. Durch Umsetzen mit Diazomethan läßt sich zeigen, daß sich Trichotoxin A-40 von A-50 durch den Besitz einer Carboxylgruppe unterscheidet. Dünnschichtchromatographisch können beide Peptide deshalb in einem basischen Fließmittel wie Chloroform-Methanol-wässr. Ammoniak (17%) unterschieden werden, nicht jedoch in neutralen wie Chloroform-Methanol-Wasser (vergl. 7.).

Dieser Unterschied war zur präparativen dünnschichtchromatographischen Trennung von Trichotoxin A-40 und A-50 im Milligrammaßstab ausgenützt worden (16). Um Trichotoxin im Grammaßstab zu trennen, wurden Vorversuche zu einer Craig-Verteilung unternommen. Von zahlreichen untersuchten Systemen wird ein großer Unterschied im Verteilungskoeffizienten von A-40 und A-50 nur durch Salzbildung mit der Carboxygruppe der Komponente A-40 erreicht. Als geeignetes System wurde die Kombination 2-Butanol/Ammoniumacetat-Puffer pH 8.9 (1:1 v/v) gefunden. Ammoniumacetat hat als flüchtiger Puffer den Vorteil, durch Lyophilisation am Hochvakuum wieder vollständig entfernbar zu sein. Zudem wird durch seine Anwesenheit die sonst auftretende Emulsionsbildung beim Verteilungsvorgang in der Craig-Apparatur verhindert. Um Denaturierung, Racemisierung usw. des Peptids zu verhindern, wurde versucht den pH-Wert des Verteilungssystems so niedrig wie möglich zu halten. In oben erwähntem System 2-Butanol/wässr. Ammoniumacetatlösung ergab sich bei pH 8.5 eine schlechte Trennung der Komponenten A-40 und A-50 infolge Verteilung über zu viele Rohre der Craig-Apparatur. Bei pH 8.7 erfolgte dagegen eine gute Trennung bei verhältnismäßig geringer Stufenzahl (Abb. 2.1.). Eine gewisse Gefahr war jedoch durch das eventuelle Absinken des pH-Wertes im Laufe der Verteilung auf 8.5 gegeben oder durch Annäherung an diesen Wert durch ungenaue Eichung des pH-Meters. Deshalb wurde das Verteilungssystem unter Verwendung einer Ammoniumacetatlösung mit pH 8.9 hergestellt. Ein Racemisierungstest auf der Chirasil-Val Säule (vergl. 3.2.) zeigte keine Racematanteile. Das auf diese Weise erhaltene Trichotoxin A-40 war nach allen untersuchten Methoden (dünnschichtchromat. Verhalten, Aminosäureanalyse, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, lytische Eigenschaften) identisch mit dem früher beschriebenen Material (16, 37). Beim Stehenlassen einer zu ^{13}C-NMR-Messungen verwendeten konzentrierten Lösung von Trichotoxin A-40 in $^{12}C,^{2}H$-Methanol kristallisierte das Peptid aus (Abb. 2.2.).

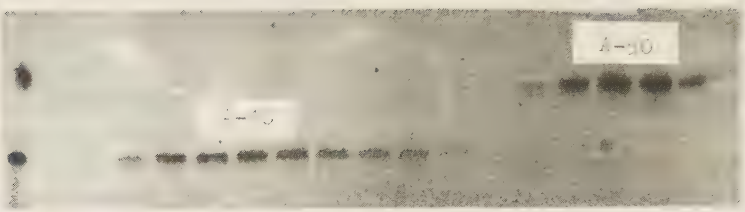


Abb. 2.1. Dünnschichtchromatogramm nach multiplikativer Gegenstromverteilung zur Trennung von Trichotoxin A-40 und A-50
10 ml Apparatur, 0,9 g auf 10 Rohre verteilt, 215 Stufen
System: 2-Butanol/Ammoniumacetat-Puffer pH 8.7 (1:1, v/v)

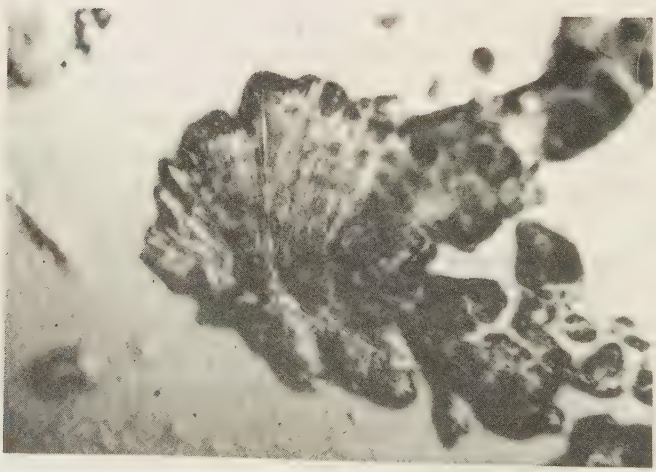


Abb. 2.2. Mikroskopische Kristallaufnahme von Trichotoxin A-40

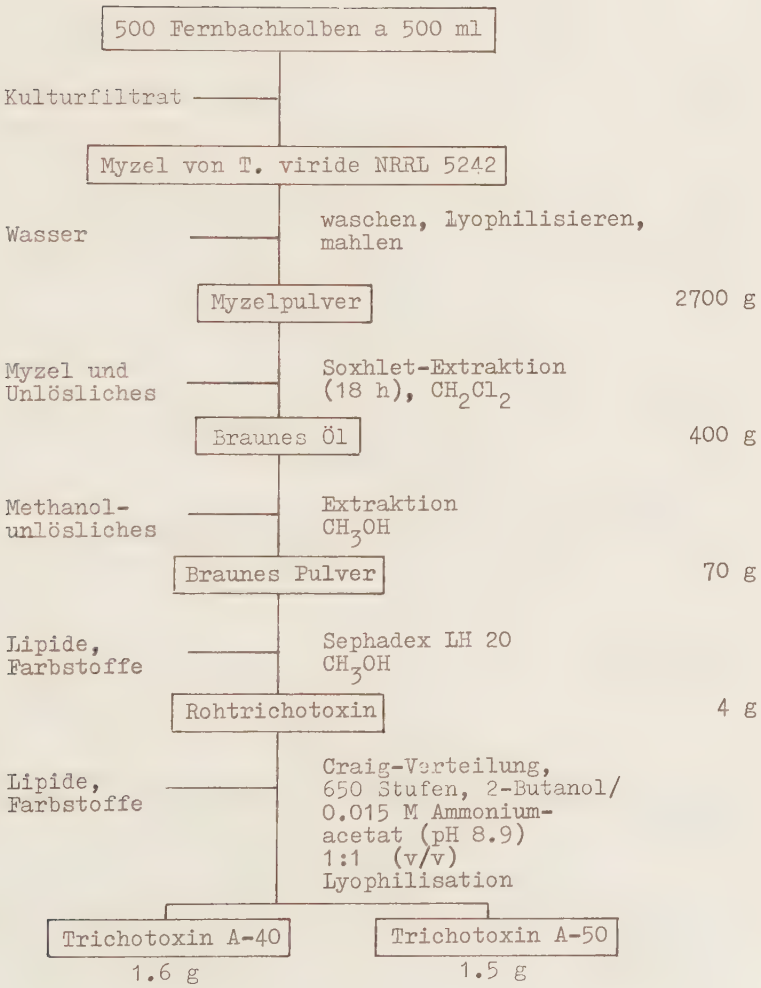


Abb. 2.3. Vergleich der Isolierung und Reinigung von Trichotoxin aus Trichoderma viride NRRL 5242 nach der neuen und früher beschriebenen Methode (16, 37)
vergl. Abb. 2.4.

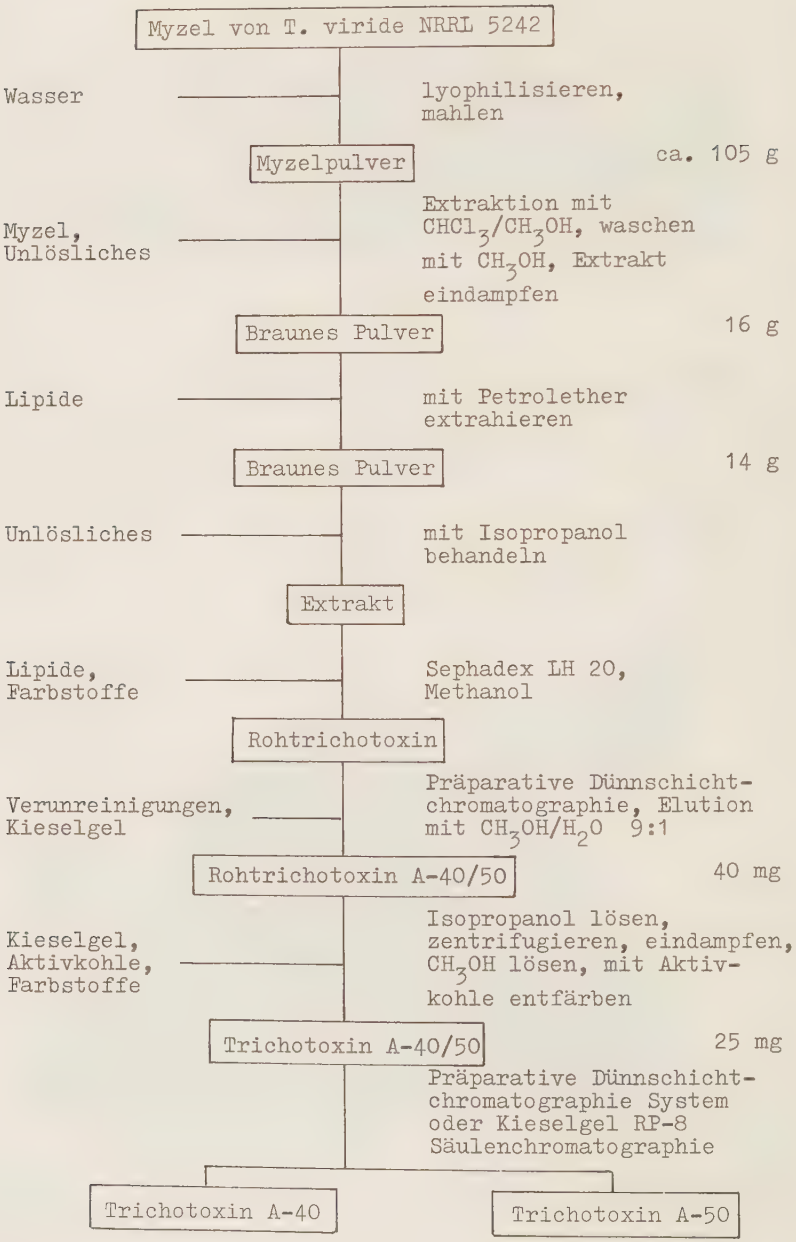

Myzel von T. viride NRRL 5242
Wasser
lyophilisieren, mahlen
Myzelpulver
ca. 105 g
Myzel, Unlösliches
Extraktion mit $CHCl_3/CH_3OH$, waschen mit CH_3OH, Extrakt eindampfen
Braunes Pulver
16 g
Lipide
mit Petrolether extrahieren
Braunes Pulver
14 g
Unlösliches
mit Isopropanol behandeln
Extrakt
Lipide, Farbstoffe
Sephadex LH 20, Methanol
Rohtrichotoxin
Verunreinigungen, Kieselgel
Präparative Dünnschicht-chromatographie, Elution mit CH_3OH/H_2O 9:1
Rohtrichotoxin A-40/50
40 mg
Kieselgel, Aktivkohle, Farbstoffe
Isopropanol lösen, zentrifugieren, eindampfen, CH_3OH lösen, mit Aktiv-kohle entfärben
Trichotoxin A-40/50
25 mg
Präparative Dünnschicht-chromatographie System oder Kieselgel RP-8 Säulenchromatographie
Trichotoxin A-40
Trichotoxin A-50

Abb. 2.4.

3. Charakterisierung von Trichotoxin A-40, Bestimmung des N- und C-Terminus

3.1. Identifizierung der Aminosäuren

Für Trichotoxin war folgende Aminosäurezusammensetzung gefunden worden (37): Glx_2, Pro_1, Gly_1, Ala_2, Aib_{10}, Leu_2 (18 Aminosäuren). Die Analyse ergab jedoch bei einigen Aminosäuren keine ganzzahlige Stöchiometrie. Dies konnte durch Mikroheterogenität bei der Biosynthese des Peptids bedingt sein. Auch bislang nicht gefundene Komponenten mussten in Betracht gezogen werden. Ein Hinweis darauf war das in ^{13}C-NMR-Spektren beobachtbare Signal bei 7.7 ppm (vergl. 5.2.), das durch keine der obigen Aminosäuren verursacht sein konnte. Die in der Natur selten vorkommende Aminosäure Isovalin in Antiamoebin und Emerimicin gibt z. B. ein Signal in diesem Bereich (18). Zur Klärung dieser Frage wurde deshalb die Gaschromatographie und Massenspektrometrie herangezogen.

3.1.1. Qualitative Aminosäureanalyse durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die durch Totalhydrolyse des Trichotoxin A-40 erhaltenen Aminosäuren wurden mittels Isopropanol/HCl verestert und mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert. Durch anschließende Gaschromatographie (GC) und kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Elektronenstoß (EI) und Chemische Ionisation (CI)-Massenspektrometrie wurden folgende Komponenten identifiziert: Valol bzw. Vol (Valinol), Ala, Aib, Gly, Iva (Isovalin), Leu, Pro und Glu. Diese GC-MS - Untersuchungen gaben auch die ersten sicheren Hinweise auf die zusätzlich im Trichotoxin enthaltenen und vorher nicht gefundenen Komponenten Isovalin (Iva) (vergl. 3.2.3. und Abb. 3.1.) und Valinol (Vol) (vergl. Abb. 3.1. und 3.2.).

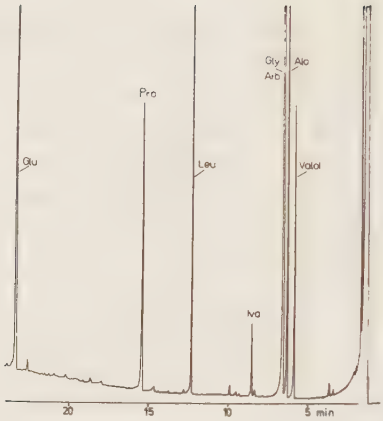


Abb. 3.1. GC des Totalhydrolysates (6n HCl/110°C/18 h) von Trichotoxin A-40 nach Veresterung mit Isopropanol/HCl und Trifluoracetylierung.
Bedingungen: 25 m Glaskapillarsäule SE 30, Trägergas H_2, Druck 0.5 bar, Temp. Programm: 80°C, dann 3°C/min

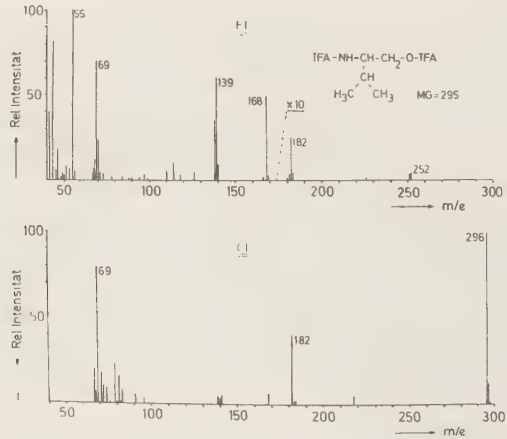


Abb. 3.2. EI- und CI-Massenspektren (70 eV) des N,O-Bis-trifluoracetyl-valinol aus Trichotoxin A-40

Gly und Aib werden unter diesen Bedingungen zusammen von der Säule eluiert, können aber massenspektrometrisch nebeneinander nachgewiesen werden. Iva gibt, verglichen mit den anderen Aminosäuren, ein kleineres Flächenintergral. Grund hierfür dürfte neben dem Vorliegen von < 1 Äqu. im Trichotoxin auch eine durch sterische Hinderung bedingte Derivatisierungsausbeute (vergl. auch Abb. 3.6.) sein. EI- und CI-Massenspektren der N-Trifluoracetyl-isovalin-isopropylester unterscheiden sich praktisch nicht vom entsprechend derivatisiertem Valin, verschieden sind jedoch die GC-Retentionszeiten.

3.1.2. Quantitative Aminosäureanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie

Die Aminosäureanalyse auf dem Biotronik-Aminosäureanalysator ergab eine ausgezeichnete Trennung aller durch Totalhydrolyse des Trichotoxin erhaltenen Komponenten in einem Lauf (Abb. 3.3.). Die vergleichsweise geringe Farbausbeute der α-Aminoisobuttersäure mit Ninhydrin (ca. 6 % der Leu-Fläche) war bereits bei der Sequenzierung des Alamethicin aufgefallen (10). Durch Unkenntnis dieser Tatsache wurden vermutlich früher bei Trichotoxin A (30) und Antiamoebin (24) viel zu niedere Aib-Werte ermittelt. Verhältnismäßig schwache Peaks bei Retentionszeiten von 38.3 min. bzw. 83.3 min. wurden als Isovalin bzw. Valinol identifiziert. Isovalin erscheint im Elutionschromatogramm an derselben Stelle wie Valin, weist aber im Gegensatz zu diesem in Analogie zur α-Aminobuttersäure einen sehr schwachen Anfärbefaktor auf (ca. 5 % der Leu-Fläche). Dadurch, sowie durch den relativ geringen Isovalin-Gehalt des Peptids überhaupt, wurde dieser Peak früher als zu vernachlässigende Valin-Verunreinigung angesehen (G. Irmscher, persönliche Mitteilung). Der Aminoalkohol Valinol war aufgrund seines ebenfalls extrem niederen Anfärbefaktors (ca. 6 % der Leu-Fläche) früher ebenfalls nicht gefunden worden. Um möglichst genaue Faktoren für die quantitative Aminosäureanalyse zu erhalten, wurde eine Aminosäure-Testmischung hergestellt.

Diese entsprach etwa der Zusammensetzung des Trichotoxin und enthielt auch α-Aminobuttersäure, Isovalin und Valinol (Details vergl. 7.). Als ausreichende Hydrolysezeit für Trichotoxin mit 6 n HCl wurden 18 h/110 °C in Übereinstimmung mit der Literatur (10, 11) festgestellt. Aminosäurenanalysen ergaben im Mittel folgende Verhältnisse:

Glu: 1.91, Pro: 1.10, Gly: 0.89, Ala: 1.74, Aib: 8.81, Iva: 1.19[+], Leu: 2.00, NH_4^+: 1.08, Valinol: 1.10

Aus den weitgehend stöchiometrischen Werten und aufgrund der dünnschichtchromatographischen Reinheit in allen untersuchten Systemen nach der Craig-Verteilung wurde zunächst auf ein Peptid der Zusammensetzung $Glx_2Pro_1Gly_1Ala_2Aib_9Iva_1Leu_2Valinol_1$ (= 19 Komponenten) geschlossen. Untersuchungen von Partialhydrolysaten zeigten jedoch, daß die teilweise Nichtstöchiometrie auf Austausch von Gly/Ala, Aib/Ala und Iva/Aib, also auf Mikroheterogenität des Peptids zurückzuführen ist. Tatsächlich wird eine Sequenz aus 17 Aminosäuren und einem Aminoalkohol gebildet.

[+]Der Isovalingehalt in Trichotoxin A-40 wurde durch Aminosäureanalyse immer zu hoch gefunden. Auch in Partialsequenzen die nach GC, GC-MS, Edman-Abbau und ^{13}C-NMR - Spektroskopie eindeutig kein Iva enthielten wurde an der Stelle des Iva im Chromatogramm des Aminosäureanalysators ein kleiner Peak gefunden. Ursache könnte neben einer Artefaktbildung das Vorliegen von Valin-Spuren sein. Diese würden aufgrund des im Vergleich zum Iva viel größeren Anfärbefaktors einen beträchtlichen Isovalingehalt vortäuschen (vergl. hierzu die Partialsequenzen in Abschn. 4.4.).

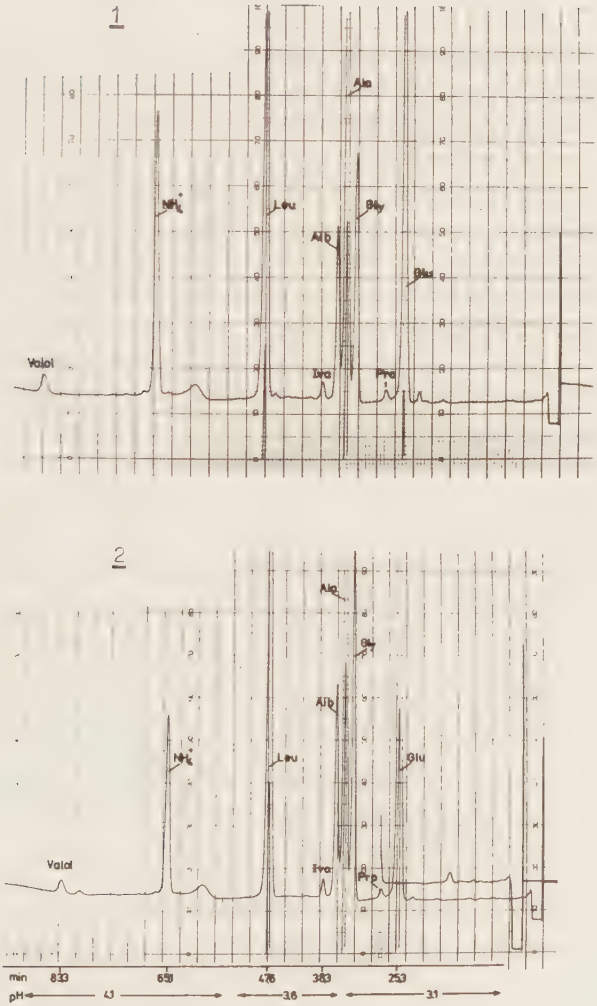


Abb. 3.3. Elutionschromatogramm eines Totalhydrolysates von Trichotoxin A-40 =1 und einer Testmischung =2, die annähernd dieser Zusammensetzung entspricht (Biotronik-Aminosäureanalysator LC 6000 E, Ninhydrin-Anfärbung, λ =570 nm).

3.1.3. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Zur weiteren Charakterisierung der im Trichotoxin A-40 vorhandenen Aminosäuren wurde eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie eines Totalhydrolysates auf Kieselgelplatten durchgeführt. Als geeignetste Kombination von Fließmitteln, welche alle Aminokomponenten zu trennen vermochte, erwies sich das System III (1. Dimension) und VII (2. Dimension) (Abb. 3.4.). Zum Vergleich wurden die in Trichotoxin durch Aminosäureanalyse und GC-MS identifizierten Aminosäuren mit aufgetragen. Auch weitere, im Abschn. 7. angeführte Fließmittelkombinationen bestätigen diese Aminosäurenzusammensetzung. Mit Ausnahme von Prolin, welches durch Ninhydrin gelb angefärbt wird, ergaben alle Aminosäuren rotviolette Färbungen. Bemerkenswerterweise sind auch Isovalin und Valinol, trotz ihres niederen Anfärbefaktors in der Aminosäureanalyse, sehr deutlich zu erkennen. Übereinstimmend mit den zuvor angewandten Methoden wurden als Komponenten des Trichotoxin A-40 gefunden:

Glu, Pro, Gly, Ala, Aib, Iva, Leu, Vol.

Zusätzliche ninhydrin-positive Verbindungen traten nicht auf. Im Hinblick auf Schwierigkeiten die bei der Ermittlung der Komponenten bei fast allen Vertretern dieser Antibiotikaklasse aufgetreten waren, war dies eine wichtige Bestätigung der GC-MS- und Aminosäurenanalysen.

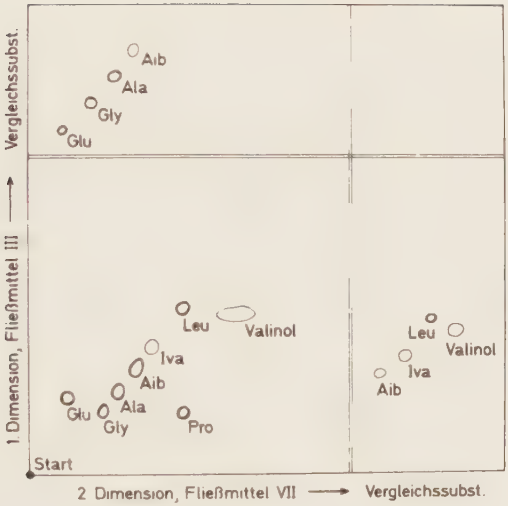


Abb. 3.4. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm der Aminosäuremischung des Totalhydrolysats von Trichotoxin A-40. Auftragung: 4 µl einer 1 proz. Lösung, Laufstrecke: je 12.5 cm. Nach Entwicklung in der 1. Dimension wird 20 min bei 110° C getrocknet. Fließmittel III = 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v), Fließmittel VII = Phenol/Wasser 75:25 (g/g).

3.2. Konfiguration der Aminosäuren[+]

Zur Ermittlung der Konfiguration der Aminosäuren wurde die Gaschromatographie an chiralen Phasen herangezogen (71). Die in Trichotoxin A-40 enthaltenen Aminosäuren und der Aminoalkohol wurden nach Totalhydrolyse des Peptids mittels 2n HCl/Isopropanol verestert und anschließend durch Pentafluorpropionsäureanhydrid acyliert. Die Trennung der so erhaltenen N-Pentafluorpropionylaminosäure-isopropylester erfolgte an der chiralen Phase L-Valin-tert.-butylamid-polysiloxan (Chirasil-Val) (72, 73). Die Zuordnung erfolgte duch Vergleich mit Testmischungen von Aminosäuren bekannter Konfiguration sowie einer Testmischung, die der ungefähren Zusammensetzung des Trichotoxin A-40 entsprach (Abb. 3.5. und 3.6.). Die Bestimmung der L-Konfiguration von Glu, Pro, Ala, Leu und Vol konnte so ohne Schwierigkeiten erfolgen. Die Konfigurationsbestimmung des Isovalin auf der Chirasil-Val Säule machte zunächst insofern Schwierigkeiten, da nur kleine Peaks im Vergleich zu den anderen Aminosäuren erhalten wurden. Die Anwesenheit im Trichotoxin A-40 war jedoch einwandfrei festgestellt worden (vergl. Abschn. 3.1. bis 3.1.3.). Als Grund dafür wird neben sterisch gehinderter Derivatisierung die besondere Leichtflüchtigkeit der Iva- und Aib-Derivate und dadurch bedingter Verlust beim Entfernen von überschüssigem Lösungs- und Acylierungsmittel angenommen. Dies ist deutlich durch Vergleich der Abbildung 3.6. 1 und 2 erkennbar, wo in 2 trotz des hohen Gehaltes an Aib im Trichotoxin ein gleichgroßes Signal wie von Ala erhalten wurde. Günstiger für die Detektion des Isovalin war deshalb dessen Überführung in N-Trifluoracetyl-isovalin-n-propylester (vergl. Abb. 3.7.). Entsprechend derivatisiertes DL-Isovalin wird unter den in der Abb. 3.7. angegebenen Bedingungen nur andeutungsweise in seine Enantiomeren getrennt. Durch Chromatographie bei niederer Säulentemperatur wird je-

---

[+]Den Herren Prof. Dr. W. A. König und Dr. K. Kruse, Universität Hamburg, sowie G. J. Nicholson, Universität Tübingen, sei für die Zusammenarbeit recht herzlich gedankt.

doch eine ausgezeichnete Trennung erhalten (vergl. Abb. 3.8. und 3.9.). Valinol für Vergleichszwecke wurde durch Reduktion von DL- und L-Valin mittels Bortrifluorid-Etherat/Natriumborhydrid erhalten (74). Das N,O-Bis-pentfluorpropionyl-valinol zeigte eine umgekehrte Retention verglichen mit α-Aminosäuren, d. h. das L-Enantiomere wird vor dem D-Enantiomere von der Säule eluiert. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde die L-Konfiguration von Glu, Pro, Ala und Leu durch Gaschromatographie auf Glaskapillarsäulen, die mit den optisch aktiven Dipeptidphasen N-Tfa-L-Phe-L-Asp-bis-cyclohexylester und N-Tfa-L-Val-L-Val-cyclohexylester (75) belegt waren gefunden. Valinol und DL-Isovalin werden auf diesen Säulen nicht getrennt. Ersteres konnte durch Umsetzen mit dem Säurechlorid von N-Tfa-L-Alanin und darauffolgender Trimethylsilylierung der Hydroxylgruppe mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid in das flüchtige Diastereomerenpaar übergeführt werden. Auf einer OV 17 Glaskapillarsäule eluierte das N-Tfa-Alanyl-Derivat des S-Valinol nach dem des R-Valinol (76). Übereinstimmend mit dem durch die Chirasil-Val Säule erhaltenen Ergebnis, wurde auch nach dieser Methode dem im Trichotoxin A-40 enthaltenen Valinol die S-Konfiguration zugeordnet. Die Bestimmung der D-Konfiguration des Isovalin in Trichotoxin A-40 und verwandten Peptidantibiotika wird in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

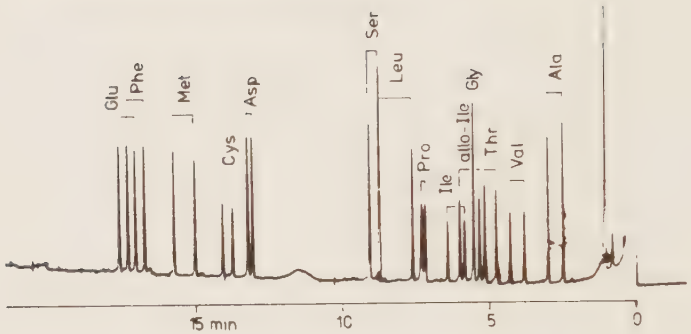


Abb. 3.5. Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluorpropionyl-DL-aminosäure-isopropylester einer Aminosäure-Testmischung auf einer Chirasil-Val Glaskapillarsäule. Bedingungen vergl. Abb. 3.6.

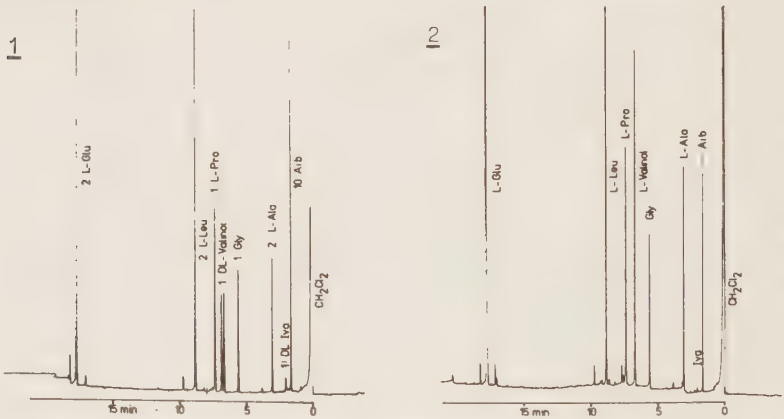


Abb. 3.6. Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluorpropionyl-aminosäure-isopropylester bzw. von N,O-Bispentafluor-isopropionyl-valinol einer ähnlich dem Trichotoxin A-40 zusammengesetzten Aminosäure-Testmischung 1 und eines Totalhydrolysates von Trichotoxin A-40 2. Bedingungen: Carlo-Erba Gaschromatograph 2101, 20 m x 0.3 mm Chirasil-Val Glaskapillarsäule, Trägergas H_2, Druck 0.35 bar, Detektor: FID, Einspritzung 1 µl. Temperaturprogramm: 2 min/ 87 °C, dann 4 °C/min bis 200 °C. (zum Isovalin-Response vergl. Abschn. 3.2. und Abb. 3.7.).

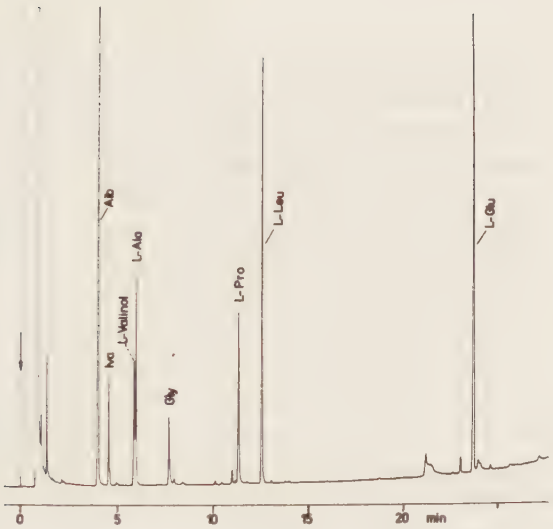


Abb. 3.7. Gaschromatographische Trennung der N-Trifluoracetyl-aminosäure-n-propylester bzw. N,O-Bis-trifluoracetyl-valinol eines Totalhydrolysates von Trichotoxin A-40. Bedingungen wie in Abb. 3.6. angegeben

3.2.1. Konfigurationszuordnung und Methoden zur Racemattrennung des Isovalin

α-Aminosäuren, deren α-H-Atom durch eine Alkylgruppe substituiert sind, können als α-Alkyl-α-aminosäuren oder 2-Alkyl-aminosäuren bezeichnet werden.[+] Ein gleichwertiger Name für α-Aminoisobuttersäure ist demnach α-Methylalanin oder 2-Methylalanin. Die einfachste optisch aktive α-Alkyl-α-aminosäure ist das Isovalin, welches dementsprechend als α-Ethylalanin oder 2-Ethylalanin bezeichnet werden kann. Isovalin war, wie unter 3.1.1. bis 3.1.3. beschrieben, als Bestandteil des Trichotoxin nachgewiesen worden. Eine Besonder-

[+]Die Bezeichnung α-Dialkyl-α-aminosäure ist ebenfalls gebräuchlich.

heit sind die chiroptischen Eigenschaften des Isovalin beim Ansäuern wässriger Lösungen. Üblicherweise zeigen L-Aminosäuren eine positive Zunahme des optischen Drehwertes beim Ansäuern ihrer wässrigen Lösungen, D-Aminosäuren negative Zunahmen. (+)-Isovalin mit L-Konfiguration (vergl. unten) gibt jedoch eine negative Zunahme des Drehwertes und umgekehrt (-)-Isovalin eine Abnahme (Isovalin-"Ausnahme" der Clough-Lutz-Jirgenson Regel) (77). Isovalin läßt sich jedoch sowohl von α-Amino-L-buttersäure über eine formale Substitution ihres α-H-Atoms durch eine Methylgruppe, als auch von D-Alanin über eine Substitution seines α-H-Atoms durch eine Ethylgruppe ableiten (78). Enzymatische Spaltversuche an N-Chloracetyl-DL-aminosäuren zeigten, daß bei (+)-Isovalin die α-Methylgruppe die gleiche Position einnimmt wie das α-H-Atom bei L-Aminosäuren. Entscheidend für die konfigurative Zuordnung des (+)-Isovalin als L-Isovalin war deshalb nicht das optische, sondern das biologische Verhalten (77). Übereinstimmend mit dieser Zuordnung von Drehsinn und absoluter Konfiguration der Enantiomeren des Isovalin war die 1965 durchgeführte Konfigurationszuordnung durch chemische Korrelation mit 1.3.4.5.-Tetrahydroxy-cyclohexancarbonsäure-(1) (Chinasäure). Dabei wurde (+)-Isovalin die (S)-Konfiguration und (-)-Isovalin die (R)-Konfiguration zugeordnet (79, 80). Zur Trennung des Racemates von Isovalin fand bisher vorwiegend die Desacylierung von Chloracetyl-DL-Isovalin mittels Acylase I aus Schweinenieren Anwendung (81). Möglich ist auch die enzymatische Desacylierung von Trifluoracetyl-DL-α-alkylaminosäureestern durch Acylase I (82) bzw. von Trifluoracetyl-DL-α-alkylaminosäuren durch Carboxypeptidase A (83); dabei wird jeweils das (S)-Enantiomere desacyliert. Desgleichen kann eine Trennung der Enantiomeren des Isovalin über diastereomere Salze erfolgen (84, 85). Auch durch kovalent an einen festen Träger gebundenes D-Methionin konnte DL-Isovalin in die Enantiomeren getrennt werden (86). Eine Anzahl von asymmetrischen Synthesen zur Darstellung der Enantiomeren von α-Alkyl-α-aminosäuren, einschließlich des Isovalin, sind ausgearbeitet worden (87).

Derivatisierte racemische Aminosäuren können auch durch Gaschromatographie an chiralen Phasen in Enantiomere getrennt werden. Ebenso ist eine Racemattrennung an achiralen Phasen möglich, wenn eine Diasteromerenbildung z. B. mit Hilfe eines optisch aktiven Alkohols oder einer optisch aktiven Aminosäure vorausgeht (71), (vergl. hierzu 3.2.). Die Trennung der Enantiomeren von α-Alkyl-α-aminosäuren ist infolge stärkerer Abschirmung des α-C-Atoms merklich schwieriger als bei L-Aminosäuren. Eine Trennung trifluoracetylierter α-Methyl-α-DL-aminosäureester einschließlich des DL-Isovalin gelang an der Ureid-Phase Carbo-bis-(N-L-valin-isopropylester), wobei dieselbe Elutionsfolge (D vor L) auftritt wie bei α-DL-Aminosäuren (82). Die Trennung des im Murchison Meteorit gefundenen DL-Isovalin gelang als N-Trifluoracetyl-(+) - 2-pentylester an der achiralen Phase Dexsil 400 GC (88). Ferner wird über eine Trennung von N-Trifluoracetyl-DL-isovalyl-L-leucin-isopropylester an der Phase N-Docosanoyl-L-valyl-tert.-butylamid berichtet (89).

3.2.2. Gaschromatographische Bestimmung der R-Konfiguration des Isovalin in Trichotoxin A-40

Die Ermittlung der Konfiguration des Isovalin im Trichotoxin A-40 wurde nach zwei Methoden durchgeführt. Hierzu wurde aus synthetischem DL-Isovalin (90) das im Handel nicht erhältliche L-Enantiomere über den N-Benzoyl-l-menthylester isoliert (80). Nach Bildung des Diastereomeren durch Veresterung mit (+)-3-Methyl-2-butanol und Acylierung mittels Pentafluorpropionsäureanhydrid wurden die Retentionszeiten auf einer mit OV 17 belegten Glaskapillarsäule bestimmt (91). Dabei zeigte das (S)(+)-Diastereomere eine längere Retentionszeit als das (R)(+)-Diastereomere. Durch Vergleich konnte dem Isovalin im Totalhydrolysat von Trichotoxin A-40 die R-Konfiguration (d. h. (-)-D-Isovalin) zugeordnet werden. Eine ausgezeichnete Trennung aller Komponenten des Trichotoxin erreichten wir auf der optisch aktiven Phase Chirasil-Val an Glaskapillaren

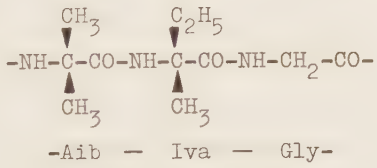
(72, 73). Eingesetzt wurden dazu Pentafluorpropionyl-aminosäure-isopropylester und Trifluoracetyl-aminosäure-n-propylester. Insbesondere bei letzteren läßt sich eine sehr gute Trennung von D- und L-Isovalin sowie eine Abtrennung von α-Aminoisobuttersäure und den anderen Komponenten erhalten. Durch Zugabe von via Methylester isoliertem D-Isovalin zu DL-Isovalin lässt sich zeigen, daß in Übereinstimmung mit Beobachtungen an der Ureid-Phase (82), auch hier das D-Enantiomere vor dem L-Enantiomeren eluiert wird (Abb. 3.8.). Aminoalkohole, wie z. B. Valinol, zeigen das umgekehrte Elutionsverhalten. Nach Zugabe eines Totalhydrolysates von Trichotoxin A-40 zu synthetischem DL-Isovalin (Enantiomerenverhältnis 1:1) sollte nach Derivatisierung und Gaschromatographie derjenige Isovalin-Peak eine Zunahme zeigen, dessen Enantiomer im Trichotoxin A-40 enthalten war. In der Tat war unschwer beim zuerst eluierten Isovalinpeak eine Flächenzunahme festzustellen, d. h. übereinstimmend mit der durch Diastereomerenbildung ermittelten Konfiguration liegt D-Isovalin im Trichotoxin A-40 vor (Abb. 3.9.).

3.2.3. Bestimmung der R-Konfiguration des Isovalin in den verwandten Peptidantibiotika Trichotoxin A-50, Antiamoebin, Stilbellin, Samarosporin (Emerimicin IV) sowie Suzukacillin A und B

Das Vorliegen der R-Konfiguration des Isovalin im Trichotoxin war insofern überraschend, da in Peptidantibiotika von sehr ähnlicher Aminosäurezusammensetzung, nämlich Antiamoebin (25-27) und Emerimicin (32) (Sequenzen vergl. Abb. 1.) die Konfigurationsbestimmung des darin enthaltenen Isovalin die S-Form ergeben hatte. Die Konfigurationsermittlung war durch Gaschromatographie der N-Trifluoracetyl-aminosäure-methylester auf gepackten Säulen mit der chiralen Phase N-Lauroyl-N'-tert.-butyl-L-valinamid durchgeführt worden. Hierbei wird jedoch, wie ein in (18) abgebildetes Gaschromatogramm zeigt, R-Iva zusammen mit Aib von der Säule

eluiert. Eine Konfigurationsbestimmung des Isovalin in allen uns zugänglichen Peptidantibiotika auf der Chirasil-Val Säule (vergl. Abschn. 3.2.2.) ergab in allen Fällen das Vorliegen der R-Konfiguration (92). Untersucht wurden neben Trichotoxin A-40 auch A-50[a], Antiamoebin[b], das mit diesem identische Peptidantibiotikum Tü 165 (= CBS 382.62)[c], Stilbellin[d], Samarosporin (Emerimicin IV)[e] und Suzukacillin[f] A und B.

Als Beispiel sei die Konfiguration des Isovalin im Antiamoebin gezeigt (Abb.). Im Peptidverband muß R-Iva in Fischer-Projektion wie folgt geschrieben werden (Sequenz 4-6 in Antiamoebin, vergl. Abb. 1.). Vergl. auch Fußnote nächste Seite!



---

a) Eigene Isolationen aus Trichoderma viride NRRL 5242, vergl. Abschn. 2.; von Prof. H. Hagemaier und Dipl.-Chem. G. Werner stammen folgende Proben: b), c) (isoliert von Dr. Brillinger, Institut für Mikrobiologie II, Universität Tübingen) und d) (Herkunft Dr. K. Sasaki, Shioogi and Co., Ltd., Japan); e) ist ein Geschenk von Dr. N. Kanda, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Japan, an Prof. G. Jung; das Peptid weist nach eigenen Untersuchungen dieselbe Aminosäurezusammensetzung auf wie Emerimicin IV (32), f) wurde als Rohware von Dr. T. Ooka, Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Japan, erhalten und durch präparative Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie an RP-8 (Merck) in die Komponenten A und B getrennt. Im Gegensatz zu B zeigt A weniger als 0.5 Äquivalente Isovalin, vermutlich bedingt durch Mikroheterogenität des Peptids.

Allen oben angeführten Personen sei herzlich für die Überlassung von Proben gedankt.

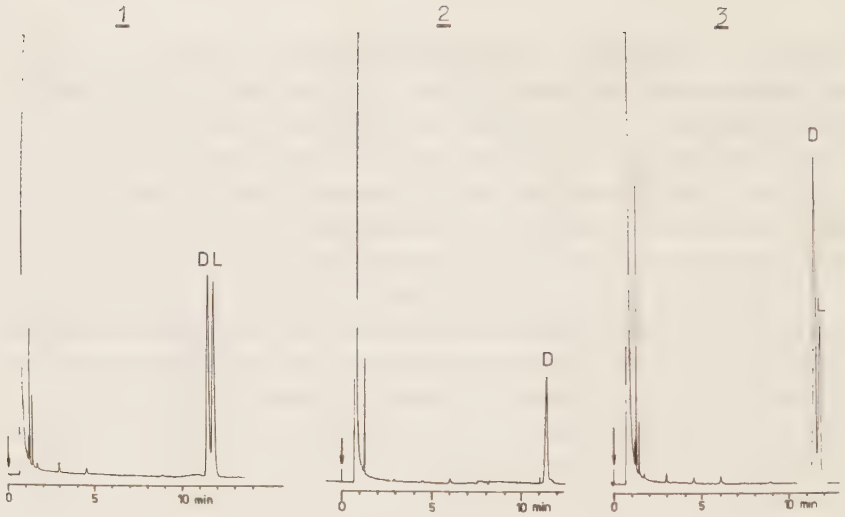


Abb. 3.8. Gaschromatographische Trennung von synthetischem N-Trifluoracetyl-isovalin-n-propylester; DL-Isovalin = 1, D-Isovalin = 2, Zugabe von D-Isovalin zu DL-Isovalin = 3; Bedingungen: Carlo-Erba Gaschromatograph 2110, 18 m x 0.3 mm Chirasil-Val Glaskapillarsäule, Temperatur 63 °C (isotherm), Trägergas H_2, Druck 0.35 bar, Detektor FID, Einspritzung 0.3 µl

---

Untersuchungen ergaben, daß sich N-Tfa-DL-Iva-OMe unter den in (18) angegebenen Bedingungen und der dort verwendeten chiralen Phase auch nicht andeutungsweise in die Enantiomeren trennen läßt.

Wir danken Mrs. R. Charles, The Weizman Institute of Science, Israel, für diese persönliche Mitteilung.

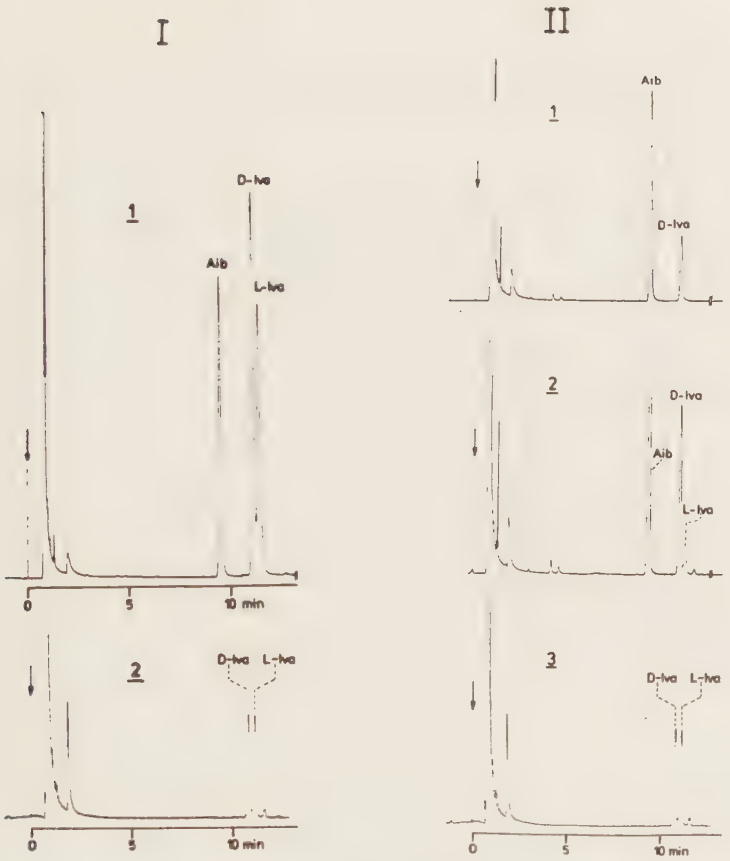


Abb. 3.9. Gaschromatographische Bestimmung der Konfiguration des Isovalin in Trichotoxin A-40 (=I) und Antiamoebin (=II).

I : GC eines Totalhydrolysates nach Zugabe von DL-Isovalin zu Trichotoxin A-40 = 1 und GC von synthetischem DL-Isovalin = 2

II: GC eines Totalhydrolysates von Antiamoebin = 1, dasselbe nach Zugabe von DL-Isovalin = 2 und GC von synthetischem DL-Isovalin = 3;

Gezeigt wird nur die Elutionsfolge bis zum Isovalin, Bedingungen vergl. Legende zu Abb. 3.8.

3.3. Methoden zum Nachweis von Ac-Aib-OH in Trichotoxin, Alamethicin und Suzukacillin; Ac-Iva-OH als Bestandteil von Suzukacillin B

Ein besonderes Problem bei der Sequenzierung der amphiphilen Polypeptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin ist die Blockierung ihrer N-Termini durch N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure (Ac-Aib-OH) und deren Identifizierung. Beim Alamethicin wurde dieser N-Terminus zunächst weder bei der klassischen Sequenzierung von PAYNE et. al. (1970) (10) noch bei der massenspektrometrischen Sequenzierung von OVCHINNIKOV et. al. (1971) (11) gefunden. Die Abwesenheit einer freien N-terminalen Aminogruppe im Molekül wurde durch eine cyclische Struktur erklärt (10, 11). Erst MARTIN u. WILLIAMS (1975) (12, 13) erkannten Ac-Aib-OH als N-Terminus aufgrund von 270 MHz-^{1}H-NMR-Messungen und nahmen deshalb anstatt der cyclischen eine lineare Struktur des Alamethicin an. Diese wurde von PANDEY et. al. (1977) (18) durch Elektronenstoß-Massenspektrometrie des Alamethicinmethylester bestätigt.

Beim Suzukacillin (5) und dem in unserem Arbeitskreis isolierten Alamethicin F-50 (16, 17) wurde Ac-Aib-OH bisher nicht direkt nachgewiesen, sondern diese N-Termini in Analogie zum Alamethicin angenommen. HOU et. al. (1972) (30) nahmen bei dem von ihnen isolierten Trichotoxin A eine cyclische Struktur aufgrund der Nichtanfärbbarkeit des Peptids mit Ninhydrin an; vermutlich liegt aber auch hier ein acylierter N-Terminus vor. In den von uns aus Trichoderma viride NRRL 5242 isolierten Trichotoxinen A-40 und A-50 (vermutlich nicht identisch mit dem oben erwähnten Trichotoxin A von HOU et. al. aus demselben Stamm), wurde ebenfalls Ac-Aib-OH als N-Terminus vermutet, konnte aber in früheren Arbeiten nicht sicher nachgewiesen werden (16, 37). Es war deshalb notwendig, eine Methode zum schnellen, einfachen und sicheren Nachweis von N-acylierter α-Aminoisobuttersäure in diesen und ähnlich aufgebauten Peptidantibiotika auszuarbeiten (61).

3.3.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis

Im Verlaufe der vorliegenden Sequenzierung war gezeigt worden, daß neben der besonders säurelabilen ...-Aib-Pro-... Peptidbindung (Abschn. 4.2.) auch andere Ac-Aib-Aminosäure-Bindungen wie z. B. in Ac-Aib-Gly-OH und Ac-Aib-Ala-OH sehr leicht acidolytisch angegriffen werden. Insbesondere die Einwirkung von wasserfreier Trifluoressigsäure (aber auch wässriger HCl, Mischungen von Alkohol/wässr. HCl, HCl in Eisessig u. a. Säuren) bewirken eine selektive Abspaltung von N-terminalem Ac-Aib-OH vom Peptid. Dieses kann nach Chromatographie auf Kieselgel-Dünnschichtplatten direkt aus dem Partialhydrolysat anhand seines R_F-Wertes und mittels Vergleichsmaterial durch Anfärben mit Chlor/o-Tolidin oder TDM-Reagenz (93) u. Abschn. 7. identifiziert werden. N-Propionyl-α-aminoisobuttersäure (Prop-Aib-OH) und N-Propionyl-α-aminoisobuttersäure (Prop-Aib-OH) wurden in die Untersuchungen vergleichend mit einbezogen, da N-Formyl-Aminosäuren als N-Termini bei den Gramicidinen (94) und Melittinen (95) bekannt sind. Von zahlreichen untersuchten Fließmitteln vermochten nur die ähnlichen Systeme I und II (Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser-Mischungen, vergl. Tab. 3.1.), alle drei N-acylierten 2-Methylalanine zu trennen. Diese Fließmittel bewirken zugleich eine gute Trennung weiterer bei der Acidolyse entstehende Spaltprodukte. Zur Unterscheidung von zufällig ähnlich laufenden Spaltprodukten kann außerdem die acidolytisch abgespaltene N-Acyl-α-aminoisobuttersäure mit Diazomethan verestert und dünnschichtchromatographisch als Ac-Aib-OMe anhand von Vergleichsmaterial identifiziert werden (Abb. 3.10.). Die in dieser Arbeit bevorzugt verwendete, sonst in der Peptidsynthese zur Schutzgruppenabspaltung eingesetzte, wasserfreie Trifluoressigsäure bewirkt auch nach längerer Einwirkung (19 h/37 °C), keine Abspaltung der Acylgruppen von N-Acyl-α-aminoisobuttersäure.

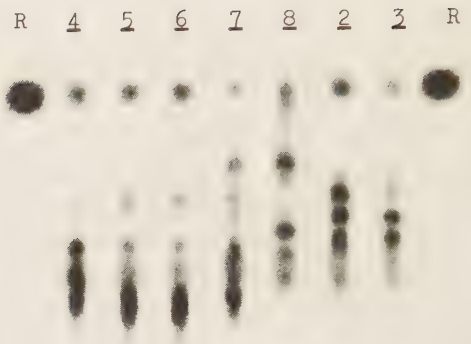


Abb. 3.10. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Ac-Aib-OH (Kieselgel, Fließmittel III) nach Trifluoracetolyse (19 h/37 °C). Alamethicin F-30 (Herkunft Upjohn Company) = 4 (7), Alamethicin F-50 = 5 (16, 17), Alamethicin F-50 (Rohextrakt) = 6 (16. 17), Suzukacillin A = 7 (5), Suzukacillin B (aus Rohextrakt isoliert) = 8 (3, 16), Trichotoxin A-40 = 2 (37), Trichotoxin A-50 = 3 (38). R = Synthetisches Ac-Aib-OH. Anfärbung mit TDM.

Tab. 3. 1. R_F-Werte von N-Acyl-Aib-Derivaten in den Fließmittelsystemen I - V (vergl. Abschn. 7.)

	I	II	III	IV	V
For-Aib-OH	0.40	0.58	0.55	0.66	0.49
Ac-Aib-OH	0.47	0.66	0.55	0.66	0.49
Prop-Aib-OH	0.60	0.74	0.64	0.77	0.59
For-Aib-OMe	0.78	0.84	0.63	0.89	0.61
Ac-Aib-OMe	0.78	0.85	0.63	0.89	0.61
Prop-Aib-OMe	0.82	0.88	0.68	0.93	0.66

For = Formyl, Ac = Acetyl, Prop = Propionyl,
Aib = α-Aminoisobuttersäure, Me = Methyl

3.3.2. Säulenchromatographische Isolierung von Ac-Aib-OH

Das durch Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 abgespaltene Ac-Aib-OH konnte auch nach Chromatographie an einer Kieselgel- und Sephadex G-10 Säule isoliert werden. Nach Veresterung mit Diazomethan wurde das erhaltene Ac-Aib-OMe durch Massenspektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum identifiziert (nähere Angaben zur Isolierung vergl. Abschn. 7.).
Massenspektrum: Ionenquellentemperatur: 230 °C, Elektronenenergie: 70 eV, Angabe der relativen Intensitäten in (%).
Fragmentierung (m/e): M^+ = 159 (4.4), M - CH_3 = 144 (0.7), M - OCH_3 = 128 (1.5), M - $COOCH_3$ = 100 (64.0), $H_2\overset{+}{N}=C(CH_3)_2$ = 58 (100)
^{1}H-NMR-Spektrum (CD_3OD): δ_{TMS}= 1.47 (Aib-CH_3), 1.92 (Ac-CH_3)
Synthetisches Ac-Aib-OH: δ_{TMS}= 1.45 (Aib-CH_3), 1.91 (Ac-CH_3)

3.3.3. Isolierung von Ac-Aib-OMe durch Sublimation des Methylesters

Bei der Veresterung von aus Trichotoxin A-40 nach Acidolyse isoliertem Ac-Aib-OH war aufgefallen, daß der Methylester bereits bei ca. 45 °C und 17 Torr sublimiert. Dies war auch die Erklärung dafür, daß nach Isolierung und Veresterung von Ac-Aib-OH mittels Diazomethan, nach dem Eindampfen und Trocknen der Proben im Vakuum, ein Verlust an Ac-Aib-OMe und eine Zunahme der (schwerflüchtigen) Verunreinigungen zu beobachten war. Durch Verwendung einer Mikrosublimationsapparatur konnte auf diesem Wege aus 156 mg Trichotoxin A-40 3.8 mg Ac-Aib-OMe erhalten werden. Diese Methode ist demnach geeignet, Ac-Aib-OH in Form seines Methylesters in mikropräparativem Maßstab, ohne Anwendung chromatographischer oder extraktiver Methoden zu isolieren (nähere Angaben vergl. Abschn. 7.).
Massenspektrum: Bedingungen wie in Abschn. 3.3.2.
Fragmentierung (m/e): M^+ = 159 (5.4), M - CH_3 = 144 (0.9), M - OCH_3 = 128 (1.8), M - $COOCH_3$ = 100 (62.2), $H_2\overset{+}{N}=C(CH_3)_2$ = 58 (100)

3.3.4. Nachweis von Ac-Aib-OH und Ac-Iva-OH durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Methode, Ac-Aib-OH durch selektive Trifluoracetolyse vom Trichotoxin A-40 abzuspalten und schonend mittels Diazomethan zu verestern gab auch die Möglichkeit, den entstehenden Methylester infolge seiner leichten Flüchtigkeit durch kombinierte Gaschromatographie - Massenspektrometrie zu identifizieren. Aus den beim dünnschichtchromatographischen Nachweis des Ac-Aib-OH dargelegten Gründen (Abschn. 3.3.1.), wurden auch hierbei For-Aib-OMe und Prop-Aib-OMe in die Untersuchungen mit einbezogen. Auf einer mit Carbowax 20 M belegten Glaskapillarsäule gelang in einer Testmischung die Trennung des For-Aib-OMe von Ac-Aib-OMe und Prop-Aib-OMe. Die letzten beiden Verbindungen wurden auf dieser Säule unter den Versuchsbedingungen nicht getrennt, konnten jedoch aufgrund ihrer einfachen Fragmentierungsschemen ohne weiteres nebeieinander charakterisiert werden. Diese entsprachen im wesentlichen denen von N-Formyl-α-aminosäure-methylestern (96) und N-Acetyl-α-aminosäureestern (97, 98). Nach dieser Methode wurde Ac-Aib-OH als N-Terminus in Alamethicinen, Trichotoxinen und Suzukacillinen bestimmt (Tab. 3.2.). Bemerkenswerterweise wurde in Suzukacillin B neben Ac-Aib-OMe ca. 20 % einer sich ähnlich verhaltenden, trifluoracetolytisch abspaltbaren und gaschromatographisch von Ac-Aib-OMe abtrennbaren Verbindung der Massenzahl m/e = 173 (M^+) gefunden. Diese Verbindung konnte durch Vergleich der Retentionszeit und des massenspektrometrischen Fragmentierungsmusters mit synthetischem Ac-Iva-OMe, eindeutig als solches charakterisiert werden (Abb. 3.18.). Im Suzukacillin B liegt demnach ein Sequenzanaloges mit dem Austausch von N-terminalem Ac-Aib-OH gegen Ac-Iva-OH vor.

Das Vorliegen von For-Aib-OH oder Prop-Aib-OH in den untersuchten Polypeptidantibiotika konnte mit keiner Methode festgestellt werden.

Tab. 3.2. Vergleich der prozentualen Häufigkeit charakteristischer Fragmente von Ac-Aib-OMe, erhalten durch selektive Trifluoracetolyse der amphiphilen Polypeptidantibiotika 1 - 8, Veresterung mit Diazomethan und nachfolgender GC-MS-Untersuchung (vergl. Abb. 3.11.).

Ac-Aib-OMe (synthetisches Vergleichsmaterial) = 1, Trichotoxin A-40 = 2 (37), Trichotoxin A-50 = 3 (38), Alamethicin F-30 (Herkunft: Upjohn Company) = 4 (7), Alamethicin F-50 = 5 (16, 17), Alamethicin F-50 (Rohextrakt) = 6 (16, 17), Suzukacillin A = 7 (5), Suzukacillin B (aus Rohextrakt isoliert) = 8 (3, 16).

m/e	1	2	3	4	5	6	7	8
M^+ = 159	1.9	1.6	1.4	2.3	2.6	1.8	3.0	1.0
$M - CH_3$ = 144	0.8	0.7	0.9	0.9	0.7	0.7	1.1	0.6
$M - OCH_3$ = 128	2.1	1.6	1.0	2.4	1.7	1.3	1.5	1.7
$M - COOCH_3$ = 100	54.8	63.4	53.3	63.8	62.4	55.6	65.4	48.0
$H_2\overset{+}{N}=C(CH_3)2$ = 58 (Basispeak)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Legende zu Abb. 3.11. (nächste Seite):
Gaschromatogramme 1 - 8 zur GC-MS-Bestimmung der N-Termini amphiphiler Peptidantibiotoka (vergl. Tab. 3.2.).
Testmischung von synthetischem For-Aib-OMe und nicht getrennten Ac-Aib-OMe + Prop-Aib-OMe = 1, Alamethicin F-30 (Herkunft: Upjohn Company) = 2 (7), Alamethicin F-50 (Rohextrakt) = 3 (16, 17), Alamethicin F-50 = 4 (16, 17), Trichotoxin A-40 = 5 (37), Trichotoxin A-50 = 6 (38), Suzukacillin A = 7 (5), Suzukacillin B (aus Rohextrakt isoliert) = 8 (3, 16).

Bezeichnung der Peaks: 1 = Ac-Aib-OMe (in 2-8),
2 = Ac-Iva-OMe (in 8);
1 = Ac-Aib-OMe + Prop-Aib-OMe, nicht voneinander getrennt (in 1),
3 = For-Aib-OMe (in 1)

Bedingungen: Carlo Erba FRACTOVAP 2900 Gaschromatograph, Glaskapillarsäule 25 m x 0.3 mm, belegt mit Carbowax 20 M, Temperaturprogramm: 120 °C/2 min isotherm, 3 °C/min bis 160°C, Trägergas He, 0.52 bar.
Massenspektrometer: VARIAN-MAT 112 S, Elektronenstoß-Ionisation, 80 eV, offene Kopplung GC-MS, Glaskapillare silyliert.

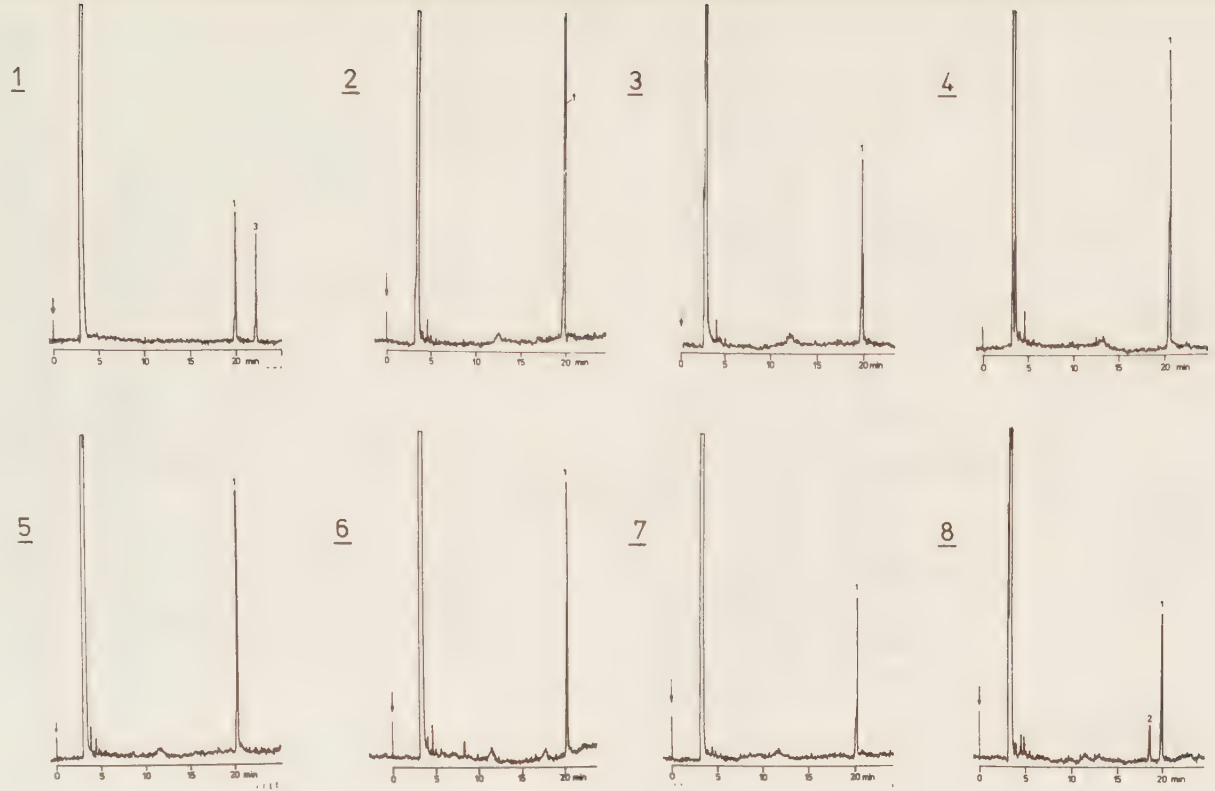


Abb. 3.11. Legende vergl. vorhergehende Seite

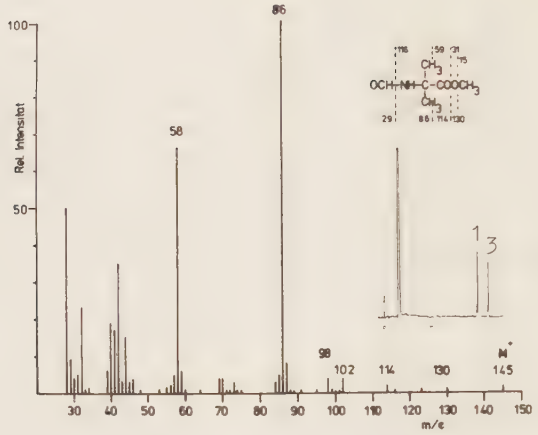


Abb. 3.12. Massenspektrum und Fragmentierungsschema von synthetischem N-Formyl-α-aminoisobuttersäure-methylester (Peak 3 im Gaschromatogramm).
Bedingungen der in Abb. 3.12 - 3.18. abgebildeten Massenspektren vergl. Legende zu Abb. 3.11.

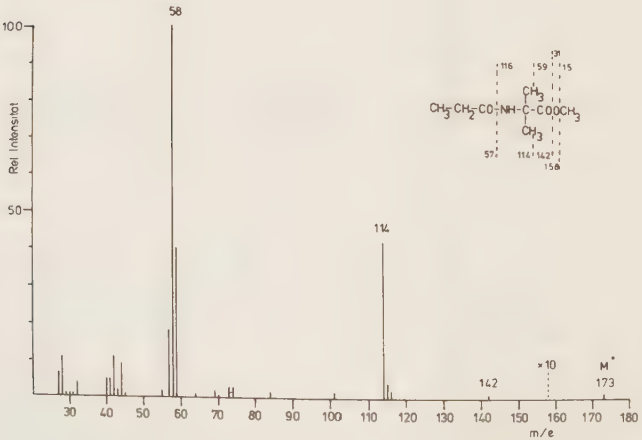


Abb. 3.13. Massenspektrum und Fragmentierungsschema von synthetischem N-Propionyl-α-aminoisobuttersäure-methylester.

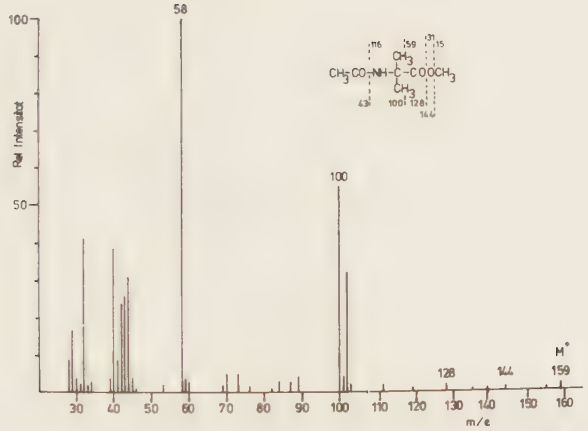


Abb. 3.14. Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von synthetischem N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure-methylester

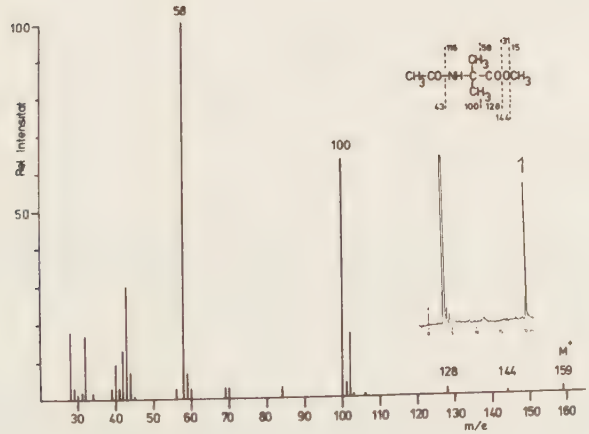


Abb. 3.15 Massenspektrum und Gaschromatogramm des aus Trichotoxin A-40 erhaltenen N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure-methylester

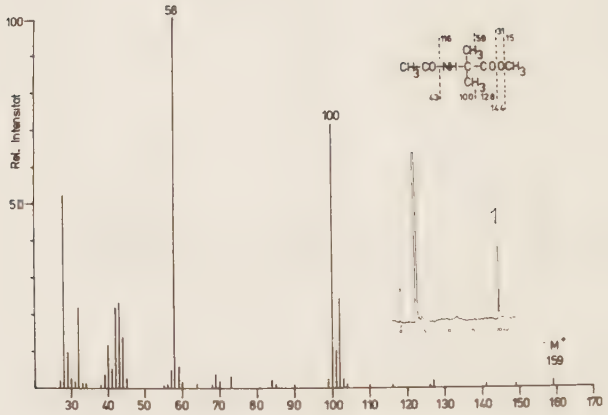


Abb. 3.16. Gaschromatogramm und Massenspektrum des aus Suzukacillin A erhaltenen N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure-methylester

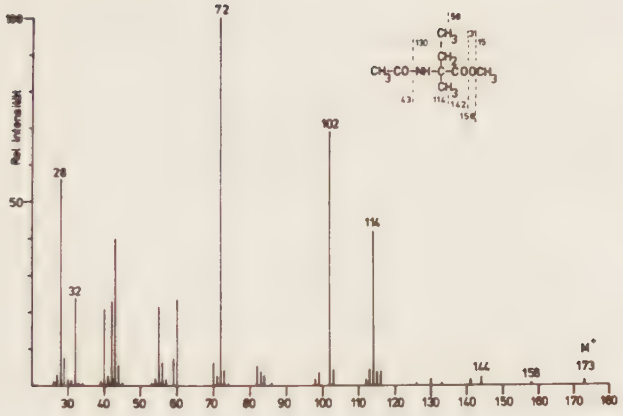


Abb. 3.17. Massenspektrum und Fragmentierungsschema von synthetischem N-Acetyl-DL-isovalin-methylester

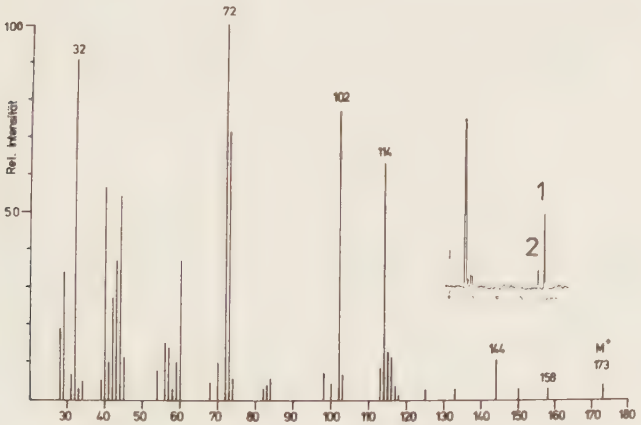


Abb. 3.18. Massenspektrum des aus Suzukacillin B erhaltenen N-Acetyl-D-isovalin-methylester (Peak 2 im Gaschromatogramm). Peak 1 ist Ac-Aib-OMe, sein Massenspektrum entspricht demjenigen von aus Suzukacillin A erhaltenen Ac-Aib-OMe (vergl. Abb. 3.16.)

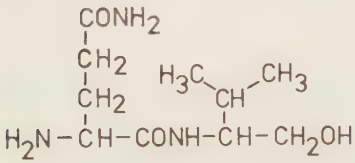
3.4. Bestimmung der Position der Glutaminsäure und des Glutamin sowie der α-Verknüpfung des Valinol im Trichotoxin A-40[+].

Nach Totalhydrolyse wurden 2 Mol Glutaminsäure und 1 Mol Ammoniak pro Mol Trichotoxin A-40 gefunden. Dies deutete darauf hin, daß ursprünglich je 1 Mol Glutaminsäure und 1 Mol Glutamin vorlagen, von denen das letztere unter den Bedingungen der Totalhydrolyse (6 n HCl/18 h/110 °C) verseift wurde. Desgleichen zeigten Titrationen mit Natronlauge, sowie die Veresterung des Trichotoxin A-40 mit Diazomethan, die Anwesenheit einer Carboxylgruppe im Molekül. Der Trichotoxin A-40-methylester konnte zudem durch Ammonolyse in das entsprechende Amid und durch Hydrazinolyse in das Hydrazid übergeführt werden (vergl. Abschn. 7.). Bemerkenswerterweise zeigt das Trichotoxin A-40-amid in allen Dünnschichtsystemen dieselben R_F-Werte wie Trichotoxin A-50. Dies würde dafür sprechen, daß die im Trichotoxin A-40 in Position 6 befindliche Glutaminsäure im Trichotoxin A-50 durch Glutamin ersetzt ist (vergl. Abb. 1.). Ein analoger Fall ist vom Alamethicin bekannt. Auch hier wird angenommen, daß die in der Komponente F-30 enthaltene Glutaminsäure in der Komponente F-50 durch Glutamin ersetzt ist (9, 99).

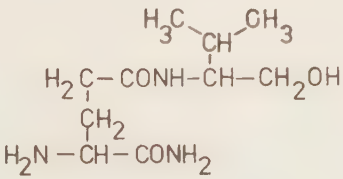
Wichtig für die Sequenzierung des Trichotoxin A-40 waren zwei nach dessen Trifluoracetolyse isolierte C-terminale N-Prolylpeptide (Abschn. 7.5.3.4.), deren Sequenzen zunächst als H-Pro-Leu-Aib-Iva(Aib)-Glx$^{\alpha/\gamma}$Vol bestimmt wurde. Desgleichen wurde eine Verbindung H-Glx$^{\alpha/\gamma}$Vol isoliert (Abschn. 7.5.3.8.). Im Gegensatz zum intakten Trichotoxin A-40 selbst, blieben die Prolylpeptide bei der Einwirkung von Diazomethan unverändert.

[+]Herrn Prof. W. A. König und seinen Mitarbeitern, den Herren H. Krohn und M. Greiner, Universität Hamburg, sei für die diesbezügliche Zusammenarbeit recht herzlich gedankt.

Die Abwesenheit einer freien Carboxylgruppe in diesen Peptiden in Verbindung mit der Aminosäureanalyse (Abschn. 7.5.3.5.) und der Molekulargewichtsbestimmung durch Felddesorptions-Massenspektrometrie (Abschn. 7.5.3.6.) ergaben das Vorliegen von Glutamin. Die Glutaminsäure musste sich deshalb im N-terminalen Dodekapeptid des Trichotoxin A-40 befinden (Abschn. 4.3.2.). Weiterhin war die Frage der Verknüpfung des in Abschnitt 3.1. und 3.2. nachgewiesenen Valinol mit dem Glutamin zu klären. Die peptidische Verknüpfung über die Aminogruppe des Aminoalkohols ergab sich aus der Nichtanfärbbarkeit des Trichotoxin A-40 mit Ninhydrin. Bei einer ebenfalls denkbaren esterartigen Verknüpfung des Valinol mit der Carboxylgruppe des Glutamin, müsste eine freie Aminogruppe nachweisbar sein. Dies ist jedoch nicht der Fall.
Ferner war zu berücksichtigen, daß sich Glutamin vom isomeren Glutaminsäure-α-amid ("Isoglutamin") nach obigen Methoden nicht ohne weiteres unterscheiden läßt. Das Vorliegen des letzteren mußte in Betracht gezogen werden. Glutaminamid kommt z. B. als C-Terminus des Bienengiftes Melittin in der Natur vor (101). Während die peptidische Verknüpfung des Valinol beim Vorliegen von Glutamin über die α-Carboxylgruppe erfolgen würde, wäre dies im Falle von "Isoglutamin" dessen γ-Carboxylgruppe:



α-Verknüpfung
H-Gln-Vol



γ-Verknüpfung
H-Glu(Vol)-NH_2

Zur massenspektroskopischen Untersuchung wurden die Verbindungen (1) - (4) (Abb. 3. 19.) mit 1.5 n HCl in Methanol bei Raumtemperatur verestert und nachfolgend mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert. Diese Umsetzungen wurden parallel mit einer zweiten Reihe von Proben durchgeführt, deren Veresterung aber durch einstündiges Erwärmen bei 100 °C vorgenommen wurde. Das Vorliegen einer α-Verknüpfung, und damit von Glutamin, konnte durch Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster von aus Trichotoxin A-40 isoliertem H-Gln-Vol (1) (Abschn. 7.5.3.8.) und denjenigen von synthetischen H-Gln-Vol (2), H-Glu(OH)-Vol (4) und H-Glu(Vol)-NH_2 (3) unter milden Veresterungsbedingungen nachgewiesen werden (Abb. 3.19.), (40 - 42).

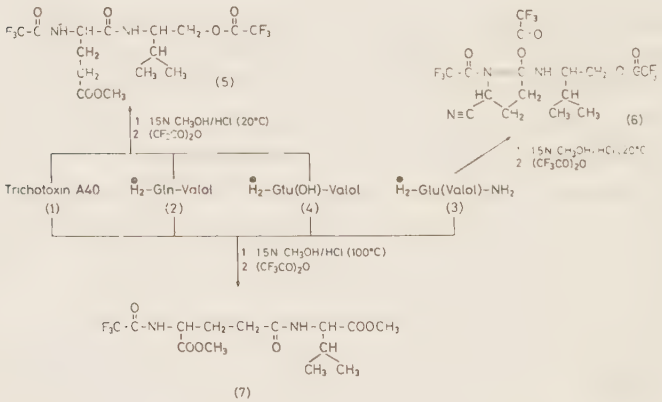


Abb. 3.19. Derivatisierung durch Veresterung mit 1.5 n HCl/CH_3OH und Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid von H-Gln-Vol aus Trichotoxin A-40 (1) und den drei Syntheseprodukten H-Gln-Vol (2), H-Glu(OH)-Vol (4) und H-Glu(Vol)-NH_2 (3).

Anm.: In obiger Abbildung sind die Verbindungen in ihrer protonierten Form geschrieben; Valol wird synonym zu Vol gebraucht.

Wird die Veresterung von (1), (2) und (4) bei Raumtemperatur durchgeführt und nachfolgend mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert, so wird in allen Fällen das Derivat (5) gebildet. In diesen ist die α-Verknüpfung des Valinol erhalten geblieben.+ Die Säureamidgruppe des Glutamin wird unter diesen Bedingungen hydrolysiert und verestert (Abb. 3.20.).

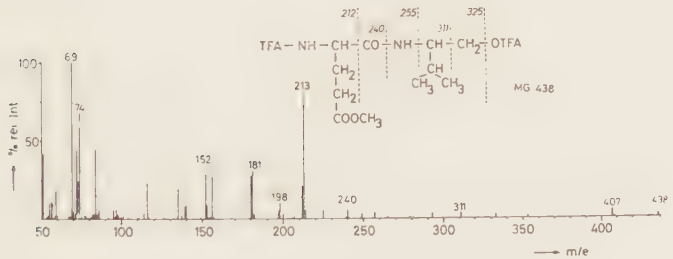


Abb. 3.20. Massenspektrum (70 eV) und Fragmentierungsmuster von N-Trifluoracetyl-glutaminsäure-γ-methylester-α-O-trifluoracetyl-valinol (5).

+Zunächst durchgeführte Versuche, die Verknüpfung des Aminoalkohols durch vermutetes unterschiedliches Acidolyseverhalten von synthetischem Z-Gln-Vol und H-Glu(Vol)-NH_2 abzuklären ergaben, daß Valinol in beiden Fällen nach 18.5 h quantitativ duch 6 n wässr. HCl/Dioxan (1:1, v/v) abgespalten wurde (vergl. Abschn. 4.2.2.3.).

Die Veresterung der Verbindungen (1) - (4) bei 100 °C und anschließender Trifluoracetylierung führt in allen Fällen neben der Hydrolyse der Säureamidgruppen zu Verbindungen, in denen der Aminoalkohol peptidisch mit der γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure verbunden ist. Bei den Verbindungen (1), (2) und (4) muß demnach eine α⟶γ-Transpeptidierung stattgefunden haben.

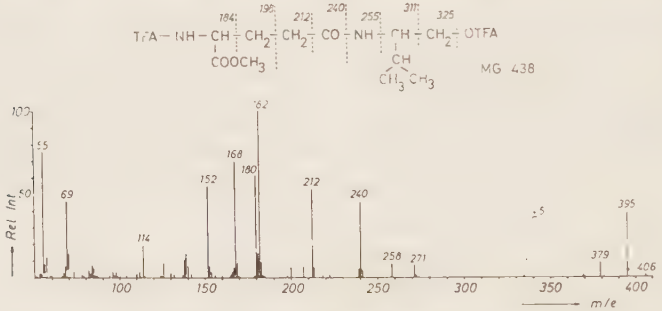


Abb. 3.21. Massenspektrum (70 eV) und Fragmentierungsmuster von N-Trifluoracetyl-glutaminsäure-α-methylester-γ-O-trifluoracetyl-valinol (7).

Der Vergleich der Massenspektren in Abb. 3.20 und 3.21 zeigt eine typische McLafferty Umlagerung bei m/e 74 des γ-Methylesters sowie sequenzspezifische Ionen bei m/e 213 (212), 240 und 311. Ferner treten Fragmentionen wie z. B. 181 (180) auf, die durch Abspaltung von CH_3OH von m/e 213 (212) entstanden sind und m/e 152 durch weitere Abspaltung von CO. Das Massenspektrum der Abb. 3.2.1. unterscheidet sich ferner von dem der Abb. 3.2 0. durch die Ionen m/e 406 (M-CH_3OH), m/e 379 (M-$COOCH_3$) sowie durch m/e 395 (M-C_3H_7). Aus der Abspaltung von CF_3CONH_2 ergibt sich der Basispeak m/e 182.

Wird H-Glu(Vol)-NH_2 (3) bei Raumtemperatur verestert und trifluoracetyliert, so erhält man das Derivat (6) mit der Molmasse

von 501. Sein Massenspektrum ist erklärbar durch die Entstehung eines Tris-Trifluoracetyl-Derivates, bei Ausbildung einer cyclischen Struktur und Dehydratisierung der Amidgruppe zum Nitril (Abb. 3.22. und 3.23.). Solche Dehydratisierungen von Säureamidgruppen sind aus der Literatur bekannt (102). Der in Abb. 3.23. gezeigte mögliche Mechanismus der zur Entstehung des cyclischen Derivates führt, ist hypothetisch und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Insbesondere erhebt sich die Frage, welchen Einfluß die 1.5 n HCl/CH_3OH vor der Trifluoracetylierung auf den Reaktionsverlauf ausübt.

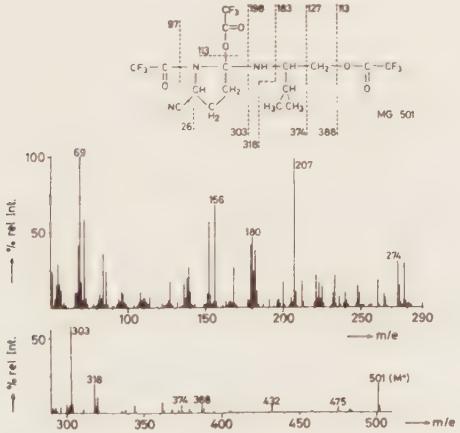


Abb. 3.22. Massenspektrum (70 eV) der bei der Derivatisierung von H-Glu(Vol)-NH_2 gebildeten cyclischen Tris-Trifluoracetyl-Verbindung.

Die Bildung einer Nitril-Gruppe wird durch den Verlust von 26 Masseeinheiten (m/e 475) angezeigt. Der cyclische Teil des gebildeten Moleküls kann durch das Hauptfragment bei m/e 303 und ein Ion von m/e 207 mit einer freien OH-Gruppe anstelle einer O-Trifluoracetylgruppe erklärt werden (Abb. 3.22.).

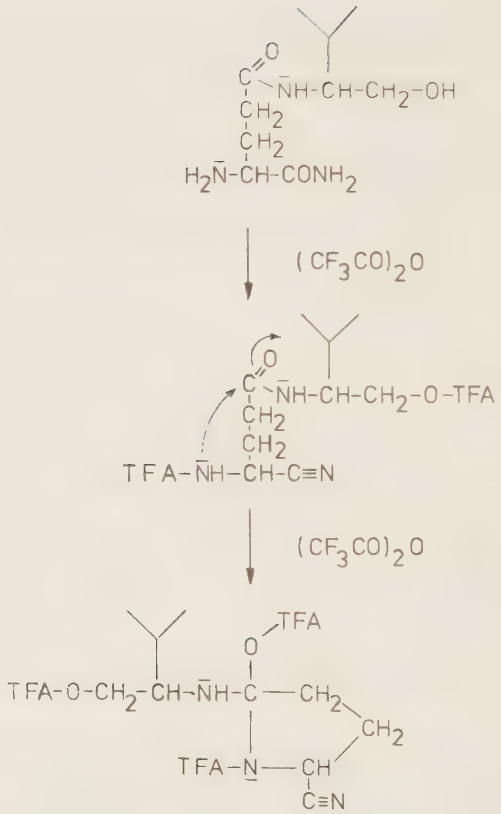


Abb. 3.23. Möglicher Mechanismus zur Entstehung der cyclischen Tri-Trifluoracetyl-Verbindung (6) bei Derivatisierung von H-Glu(Vol)-NH_2 (3) durch 1.5 n HCl/CH_3OH und Trifluoressigsäureanhydrid bei Raumtemperatur

4. Sequenzierung

4.1. Sequenzierungsstrategie

Das Kennzeichen aller Peptidantibiotika der vorerwähnten Verbindungsklasse ist ein hoher Aib-Gehalt, Blockierung der N-Termini durch einen Acetylrest und der C-Termini durch einen Aminoalkohol. Dadurch sind Sequenzierungsmethoden, die freie N- bzw. C-Termini voraussetzen wie z. B. Edman-Abbau (103) oder Endgruppenbestimmungen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (104), durch Dansylierung (105) oder wasserfreies Hydrazin (106) ohne vorhergehende Spaltung des Moleküls nicht möglich. Außerdem bewirkt der hohe Aib-Anteil eine völlige Resistenz gegenüber üblicher enzymatischer Fragmentierung, wie am Alamethicin gezeigt werden konnte (10).

Die Methode der Wahl war demnach die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), bei der die oben angeführten Hemmnisse keine wesentliche Rolle spielen, und die sich bei Sequenzierungen in dieser Verbindungsklasse schon bewährt hatte (5, 11, 18, 26, 32). Voraussetzung hierzu war eine genügende Menge von möglichst reinem Trichotoxin A-40.

Durch weitergehende Spaltung des Trichotoxin A-40 mit konzentrierter, wässriger Salzsäure war zu einem Gemisch von Oligopeptiden zu gelangen. Deren Derivatisierung sollte durch Veresterung mit Chlorwasserstoff in Methanol und darauffolgender Trifluoracetylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid erfolgen. Die so erhaltene Mischung flüchtiger N-Trifluoracetyl-peptidmethylester sollte auf Glaskapillarsäulen getrennt und durch ihre Elektronenstoß- und Chemische Ionisation-Massenspektren identifiziert werden.

In Vorversuchen zeigte sich jedoch sehr rasch, daß die GC-MS Sequenzierung des Trichotoxin A-40 nach der beschriebenen Methode zu keinem eindeutigen Ergebnis führte, wenn vom intakten Polypeptid ausgegangen wurde. Obwohl das Trichotoxin A-40 durch multiplikative Gegenstromverteilung hochgereinigt und völlig frei vom Analogen A-50 war, ergaben sich durch die Mikroheterogenität des Trichotoxin A-40 und die starke Bevorzugung bestimmter Spaltstellen Schwierigkeiten. Durch die Kombination der so erhaltenen Di- Tri- und Tetrapeptide konnte

zu keiner zweifelsfreien Primärstruktur des Trichotoxin A-40 gelangt werden. Deshalb wurde die am Alamethicin gemachte Beobachtung acidolytischer Sensitivität (Tab. 4.1.) systematisch untersucht und insbesondere in wasserfreier Trifluoressigsäure ein selektives Spaltreagens gefunden+ (Abb. 4.1.). Diese selektive Acidolyse erlaubte die präparative Gewinnung von reinen Partialfragmenten und die positionsmäßige Festlegung der Mikroheterogenität im Trichotoxin.

4.2. Säurelabilität des Trichotoxin

Wie in Abschnitt 4.1. dargelegt wurde, konnte aus den durch Acidolyse des intakten Trichotoxin A-40 erhaltenen Di- bis Tetrapeptid-Fragmenten keine sichere Sequenz aufgestellt werden. Es schien deshalb erforderlich, Trichotoxin in längerkettige Oligopeptide zu spalten und diese dann zu sequenzieren. Frühere Untersuchungen am Alamethicin wiesen auf eine große Labilität der Aib-Pro Bindung bereits bei 37 °C gegenüber 12 n HCl, 12 n HCl in Eisessig sowie Mischungen von Methanol mit 3 n HCl hin (Tab. 4.1.). Deshalb wurde versucht eine acidolytische, weitgehend selektive Spaltmethode für Trichotoxin zu finden. Als aussagekräftig erwies sich dabei die dünnschichtchromatographische Verfolgung des Reaktionsverlaufes. Entscheidend dabei war das Auffinden eines Fließmittelsystemes, welches alle durch Acidolyse entstandenen Spaltprodukte zu trennen vermochte. Von zahlreich untersuchten Fließmittelsystemen erwies sich die quarternäre Mischung Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig 65:25:4:3 (v/v) als die geeignetste. Die Trennwirkung war noch wesentlich besser als die des anfangs (Tab. 4.2.) verwendeten Systems 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v).

+Wasserfreie Trifluoressigsäure war bereits zur Ringöffnung des Aib-haltigen cyclischen Tetrapeptidantibiotikums Chlamydocin verwendet worden (51). Ferner wurde während unserer Sequenzierungsarbeiten über die Spaltung der Aib-Pro Bindung durch Trifluoressigsäure in Alamethicin berichtet (18).

Tab 4.1: Übersicht der am Markt üblichen durchgeführten Acidolysen und gefundenen Spaltprodukte

Payne et. al. (1970), (10)	Ovchinnikov et. al. (1971), (11)	Martin et. al. (1976), (13)	Pandey et. al. (1977), (18)
12 n HCl/37°/30 min: nur N-Prolylpeptide 12 n HCl/37°/60 min, 12 n HCl/60°/60 min, 12 n HCl/45°/15 h : Oligopeptide mit N-terminalen Aminogruppen	Oligopeptide erhalten mittels 6 n und 12 n HCl, Mischungen von 12 n HCl und Eisessig, Temp.: 37-100 °C, Hydrolysezeit: 1 min - 24 h. Optimal 12 n HCl/37°/5 h, Trennung der Oligopeptide über Ionenaustauscher dann MS der N-Decanoyl-peptid-methylester	3.5 n HCl/37°: Ac-Aib-OH nach 20 min im ^{1}H-NMR festzustellen, nach 2 h weitgehend abgespalten. 3 n HCl/CH_3OH/H_2O (3:1)/37° : Phol-Abspaltung	Oligopeptide für FDMS, HRFDMS: 12 n HCl/30 min - 15 h/ 24 - 60°, 12 n HCl/Eisessig/ Raumtemp./72 h Isolation eines Prolylheptapeptids nach CF_3COOH-Spaltung
Ac-Aib-OH[a)], Phol[b)]: nicht gefunden	nicht gefunden	siehe oben	bestätigt
Totalhydrolyse: 6 n HCl/105°/20 h (ausreichend) - 90 h	6 n HCl/110°/15 h	12 n HCl/65-70°/100 h	6 n HCl/110°/24 h

a) Ac-Aib-OH = N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure

b) Phol = L-Phenylalaninol

c) MS, FDMS, HRFDMS : High Resolution Field Desorption Mass Spektrometry

Temperaturangaben: °C

Beim strichförmigen Auftragen wurden selbst Dodekapeptide, die sich infolge eines Aib-Ala Austausches nur um eine Methylengruppe unterscheiden, getrennt. Zusätzliche Aussagen konnten durch Verwendung spezieller Sprühreagentien getroffen werden. Durch Isatin (107) wurden mit N-terminalem Prolin beginnende Sequenzen, durch Ninhydrin (108) Peptide mit freien Aminogruppen und durch 4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan (TDM) (109) allgemein -CO-NH- Bindungen sichtbar gemacht.
Von den untersuchten Säuren (Tab. 4.2.) erwies sich letztlich wasserfreie Trifluoressigsäure als am geeignetsten. Damit gelang es, in Trichotoxin neben der Aib-Pro Bindung auch andere Aib-Aminosäure Bindungen weitgehend selektiv zu spalten (Abb. 4.1.). Insbesondere konnte diese selektive Acidolyse auch an anderen amphiphilen Peptidantibiotika (Abb. 3.10.) und zum Nachweis von N-terminalem Ac-Aib-OH (Abschn. 3.3.) angewandt werden. Ferner konnten strukturelle Voraussetzungen der Spaltung durch die Synthese einer Anzahl von Modellverbindungen abgeklärt werden (Abschn. 4.2.2.).

4.2.1. Selektive Trifluoracetolyse von Trichotoxin A-40

Zur Festlegung der geeignetsten Spaltbedingungen wurden zeitabhängige Trifluoracetolysen am Trichotoxin durchgeführt. Durch strichförmiges Auftragen auf Dünnschichtplatten, Verwendung des Fließmittels I (Abschn. 7.) und Detektion mittels Wasser, Ninhydrin, Isatin und TDM konnten folgende Aussagen gemacht werden:

a) Detektion mit Wasser zeigte, daß das Ausgangsmaterial nach 3 h zu etwa 80 % verschwunden war, die entstehenden Produkte aber ebenfalls durch Wasser sichtbar gemacht werden konnten. Damit mußte eine Spaltung in größere Peptide erfolgt sein.
b) Blaufärbung mit Isatin ergab nach 30 min im Dünnschichtchromatogramm zwei nahe beieinander laufende Verbindungen, deren Sequenz beginnend mit N-terminalem Prolin anzunehmen war.

Tab. 4.2. Untersuchungen zur Acidolyse von Trichotoxin

Spaltreagens[a]	Zeit[b]	Temp. (°C)	Detektion der Spaltprodukte[c] Isatin	Ninhydrin	TDM[d]	Ac-Aib-OH[e]
1. HCl konz.	15 h	22°	4	4	5	+
2. HCl konz.	15 h	36°	wie oben, Flecke intensiver			+
3. 1.2 n HCl/Eisessig	15 h	36°	2	3	++	+
4. 2.0 n HCl/Methanol	17 h	36°	2	5	4	nicht untersucht (+)
5. 0.1 n $HClO_4$/Eisessig	15 h	36°	3[f]	4	5	+
6. Eisessig	21 h	40°	keine Spaltung festzustellen			
7. 70 % Essigsäure	21 h	40°			Spuren	
8. Trifluoressigsäure	30 min-3 h[g]	37°	2	3	5	+
9. CF_3COOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v)	21 h[h]	35°	2	3	5	+

a) 1 proz. Lösungen von Trichotoxin
b) Nach dieser Zeit wurden die Lösungen am Hochvakuum über P_2O_5/KOH getrocknet
c) Angegeben ist die Zahl deutlich sichtbar, getrennte Flecke; 1 proz. Lsg. in Methanol, 2-3 µl auf DS; Fließmittel: 1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
d) TDM = 4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan (vergl. Abschn. 7.)
e) Ermittelt anhand von synthetischem Vergleichsmaterial
f) Ein Fleck davon ist stark lipophil und tritt bei keiner anderen Säurespaltung auf
g) Nach 30 min schwache, nach 3 h sehr starke Anfärbung
h) 21 h 9 entspricht etwa 3 h 8

c) Ninhydrin färbte die N-Prolylpeptide gelb, man erhielt aber zusätzlich eine Reihe vorwiegend violettroter, aber auch rotoranger Flecke, die zu Peptiden mit N-terminalen Aminosäuren gehören mußten. Zu berücksichtigen war, daß mit N-terminalem Aib beginnende Peptide mit Ninhydrin schwächer als üblich anfärben.

d) Durch Anfärben mit TDM und durch Vergleich mit synthetischem Referenzmaterial wurde frühzeitig Ac-Aib-OH als N-terminale acidolytisch abgespaltene Aminosäure identifiziert (Abschn. 3.3.1.). Zusätzlich waren noch drei N-acylierte Oligopeptide, entstanden durch Abspaltung der Prolylpeptide aus dem Gesamtpeptid, nachweisbar.

e) Bei längerer Einwirkung von Trifluoressigsäure (19 h) entstanden durch weitergehende Spaltung der N-acylierten Oligopeptide wesentlich mehr mit Ninhydrin rotviolett anfärbbare Verbindungen.

Infolge der beobachteten Selektivität der Trifluoracetolyse war es naheliegend, diese präparativ durchzuführen, die Spaltprodukte mit geeigneten Methoden zu trennen und separat zu sequenzieren, um so zu einer eindeutigen Primärstruktur des Trichotoxin zu gelangen. Zur Gewinnung größerer Partialsequenzen schien dreistündige Trifluoracetolyse am günstigsten zu sein und die in Abb. 4.1. dargestellte Spaltung des Trichotoxin zu bewirken.

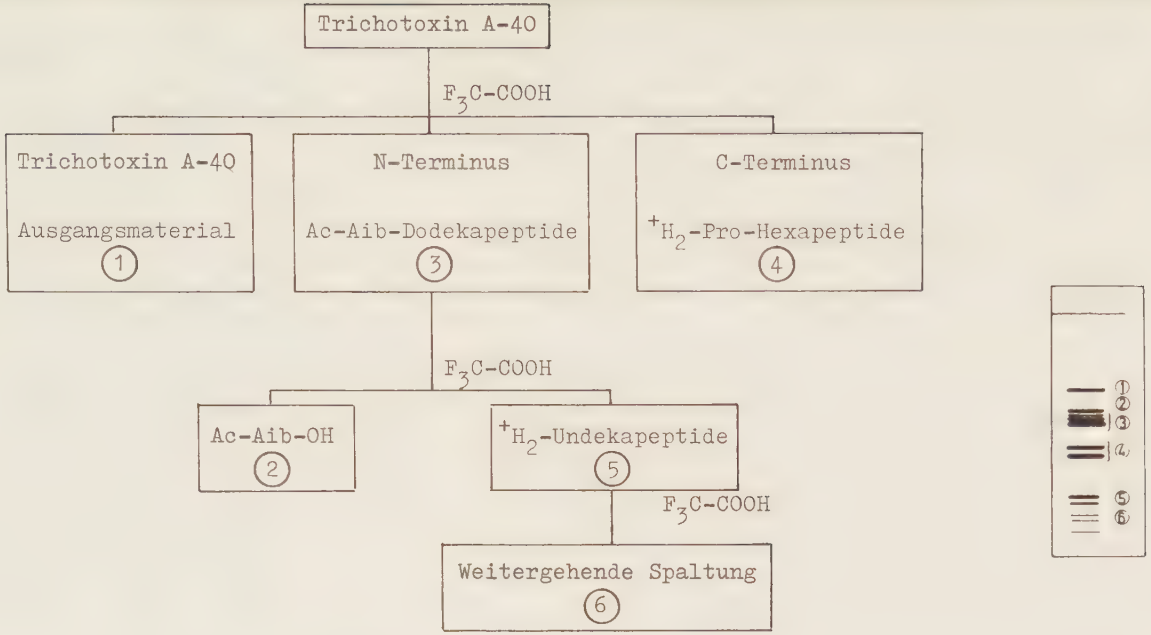


Abb. 4.1. Spaltschema vom Trichotoxin A-40 nach Trifluoracetolyse (3 h/15 min, 37 °C) und Dünnschichtchromatogramm der Spaltprodukte in Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig 65:25:4:3 (v/v)

4.2.2. Acidolytische Spaltung von Modellpeptiden

Bei den Vorversuchen zur Spaltung des Trichotoxin A-40 (Abschn. 4.2.) sowie während der Isolierung und Sequenzierung der Spaltprodukte (Abschn. 4.3. und 4.4.) hatte sich gezeigt, daß mit Säuren neben der Aib-Pro Bindung auch die Ac-Aib-Gly und Ac-Aib-Ala Bindungen recht selektiv gespalten werden. Zusätzlich war die Gln-Vol Bindung der aus Trichotoxin A-40 isolierten N-Prolylpeptide acidolytisch spaltbar (Tab. 4.6.). Um diese Beobachtungen noch einmal klar und überschaubar herauszustellen, wurde parallel zu den Sequenzierungsversuchen eine Anzahl von Modellpeptiden synthetisiert und deren Verhalten gegen Acidolyse untersucht. Dabei ergab sich eine weitestgehende Übereinstimmung zwischen dem Verhalten des Trichotoxin (Abschn. 4.2.1.) und dem der entsprechenden Modellverbindungen (Tab. 4.3. und 4.6.).
Die Verfolgung des Reaktionsverlaufes geschah dünnschichtchromatographisch, die mengenmäßige Abschätzung der Spaltprodukte erfolgte durch Anfärbung mit Ninhydrin, TDM und Isatin. Eine quantitative Bestimmung der acidolytisch freigesetzten Aminosäuren bzw. des Aminoalkoholes ermöglichte ein Aminosäureanalysator.

4.2.2.1. Trifluoracetolyse von Ac-Aib-Pro-NH_2

Von besonderem Interesse war die acidolytische Spaltung der Aib-Pro Bindung, da Ac-Aib-Pro den N-terminalen Teil der Alamethicine und des Suzukacillin A und B bilden. Im Trichotoxin hingegen wird der C-Terminus durch eine Verknüpfung von Aib mit dem Prolylhexapeptid gebildet (vergl. Abb. 1.). In allen Fällen ist die Aib-Pro Bindung außerordentlich leicht acidolytisch spaltbar. Die für das Modell Ac-Aib-Pro-NH_2 ermittelte ca. 50 %ige Spaltung mit wasserfreier Trifluoressigsäure nach 15 min dürfte tatsächlich noch wesentlich früher erreicht sein (nach ca. 8 min), da das Aufarbeiten der Probe etwa 1 min benötigt (Abb. 4.2. und Tab. 4.4.).

Tab. 4.3. Acidolytische Spaltung von Aib-Peptiden, dünnschichtchromatographische Abschätzung des Reaktionsverlaufes

Verbindung	Spaltreagens	Temp. (°C)	Konz.	Spaltung	
Ac-Aib-Pro-NH_2 [+]	32% HCl	36°	2%	+	Nach 15 min deutl. sichtbare Spaltung, nach 3.5 h >80%, nach 26 h vollst. gespalten (danach auch ca. 80% des Prolinamids verseift)
	CF_3COOH	36°	2%	+	Nach 5 min deutl. sichtb. Spaltung, nach 3.5 h >90%
	CF_3COOH	37°	1%	+	Nach 45 min ≫50% gespalten, nach 23 h ≫ 95%
-"-	1.2 n HCl/ Eisessig	36°	2%	+	Nach 5 min deutl. sichtbare Spaltung, nach 23 h 100%
	-"-	37°	1%	+	Nach 3 h >70% gespalten, nach 23 h 100%
	Eisessig, 100%ig	40°	1%	-	Nach 21 h 20 min im DS nur eine Spur von Prolinamid zu sehen,<5%
	Essigsäure 70%	40°	1%	-	Nach 21 h 20 min im DS nur eine Spur von Prolinamid zu sehen,>5%

[+]Meinem Kollegen, Herrn W. Mayr, danke ich sehr herzlich für die Überlassung einer Probe

Tabelle 4.3. (Fortsetzung)

Verbindung	Spaltreagens	Temp. (°C)	Konz.	Spaltung	
Boc-Aib-Pro-$NHNH_2$	CF_3COOH	36°	3.8%	-	Nach 6 min Boc-Gruppe abgespalten, auch nach 45 min keine Spaltung der Aib-Pro-Bindung zu beobachten.
Boc-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe	CF_3COOH/CH_2Cl_2 5 : 2	22°	9.3%	-	Nach 30 min ist die Boc-Gruppe vollst. abgespalten, im DS keine Prolylfragmente zu beobachten (110, 111)
Ac-Aib-Ala-OMe	1 n HCl/Eisessig	36°	1%	+	Nach 3 h ~ 70% gespalten, nach 23 h 100%
-"-	CF_3COOH	36°	1%	+	Nach 3 h ~ 50% gespalten, nach 23 h > 95%
Ac-Aib-Ala-OH	-"-	37°	0.43%	+	Nach 3 h ~ 50% gespalten, nach 23 h 100%
Ac-Ala-Aib-OMe	-"-	37°	1%	-	Nach 6 h und 19 h nur eine Spur Spaltprodukt festzustellen
Ac-Ala-Aib-Ala-OMe	-"-	37°	0.6%	-	Nach 3 h ist nur eine Spur H-Ala-OMe zu sehen, auch nach 23 h liegen ≧ 90% Tripeptid unverändert vor
Ac-Aib-Gly-OBzl(OH)	-"-	37°	0.8%	+	Nach 3 h ~ 50% gespalten

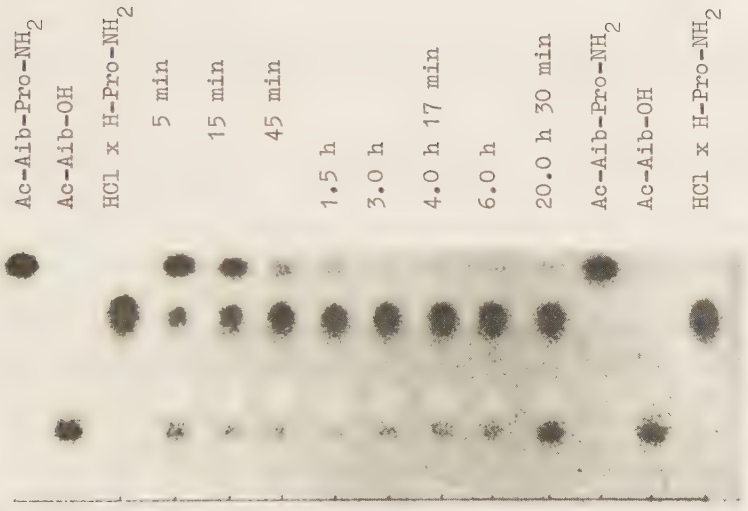


Abb. 4.2. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Spaltung von Ac-Aib-Pro-NH_2 mittels Trifluoressigsäure (c = 20 mmol/l, T = 37 °C), Anfärbung mit TDM, Fließmittelsystem VIII

Die quantitative Verfolgung der Trifluoracetolyse des Ac-Aib-Pro-NH_2 konnte durch die Bestimmung des freigesetzten Prolinamid erfolgen. Nach 15 min waren 51.8 % des Ausgangsmaterials in Ac-Aib-OH und H-Pro-NH_2 gespalten (Tab. 4.4.).

Tab. 4.4. Quantitative Bestimmung des aus Ac-Aib-Pro-NH_2 durch wasserfreie Trifluoressigsäure abgespaltenen H-Pro-NH_2 auf einem Beckman-Aminosäureanalysator (c = 85 mmol/l, T = 37°C)

Hydrolysedauer min	Prolinamid mmol/l	Prolinamid %
5	30	35.3
15	44	51.8
47	83	97.6
90	85	100.0

4.2.2.2. Trifluoracetolyse von Ac-Aib-Ala-OH, Ac-Aib-Gly-OH und Ac-Ala-Aib-OMe

Im Trichotoxin wird der N-Terminus durch die Aminosäuren Ac-Aib-Gly- bzw. infolge Sequenzaustausch von Ac-Aib-Ala- gebildet. Die trifluoracetolytische Spaltung kann an den Modellen Ac-Aib-Gly-OH und Ac-Aib-Ala-OH nachvollzogen werden (Abb. 4.3., Tab. 4.5.). Während bei diesen Peptiden ca. 50 % der Peptidbindung nach 3 h gespalten werden, sind bei Ac-Ala-Aib-OMe erst nach 6 h deutliche Anzeichen einer Spaltung feststellbar (Abb. 4.5.1.)

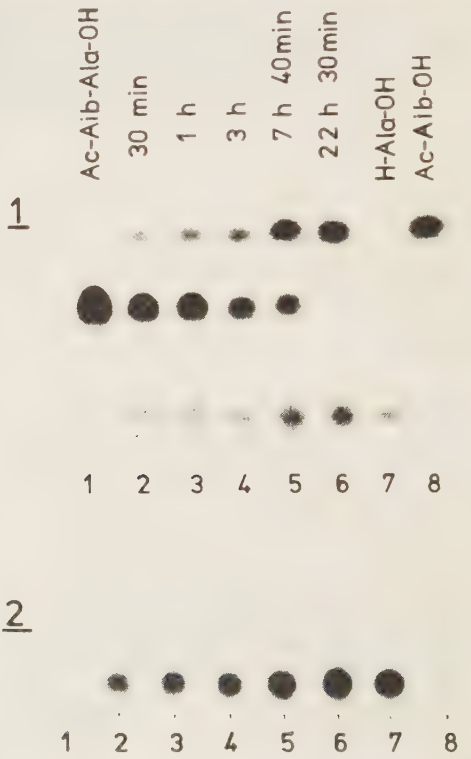


Abb. 4.3. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Spaltung von Ac-Aib-Ala-OH mittels Trifluoressigsäure (c= 20 mmol/l, T = 37 °C), Anfärbung der Spaltprodukte mit TDM = 1 und Ninhydrin = 2

Die -CO-NH- Bindungen enthaltenden Verbindungen Ac-Aib-Ala-OH und Ac-Aib-OH werden durch TDM besonders gut angefärbt, das aus dem Dipeptid abgespaltene Alanin durch Ninhydrin (Abb. 4.3.). Bei der dünnschichtchromatographischen Abschätzung der Mengenverhältnisse ist die Nichtlinearität der Anfärbung zu berücksichtigen.
Eine quantitative Bestimmung des aus Ac-Aib-Ala-OH durch wasserfreie Trifluoressigsäure abgespaltene Alanin erfolgte auch auf dem Biotronik Aminosäureanalysator. Hierbei wurde der durch Totalhydrolyse des Dipeptids (6n HCl/105 °C/18 h) vom automatischen Integrator erhaltene Flächenwert für Alanin gleich 100 % gesetzt (Tab. 4.5.)

Tab. 4.5. Quantitative Bestimmung des aus Ac-Aib-Ala-OH durch wasserfreie Trifluoressigsäure abgespaltene H-Ala-OH auf dem Biotronik-Aminosäureanalysator (c = 20 mmol/l, T = 37 °C)

Acidolysedauer	Anteil der Alaninfläche in % bezogen auf 100 %ige Spaltung
1o min	5.08
30 min	13.08
1 h	23.70
3 h	50.24
7 h 40 min	81.15
14 h 40 min	90.18
Totalhydrolyse	100.0

1

2

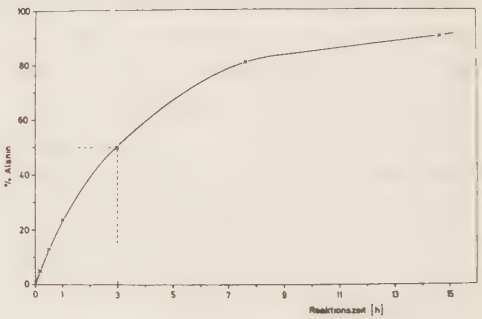


Abb. 4.4. Quantitative Bestimmung des aus Ac-Aib-Ala-OH trifluoracetolytisch abgespaltenen H-Ala-OH auf dem Biotronik Aminosäureanalysator = 1 und Zunahme der Alaninfläche in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer = 2
(c = 20 mmol/l, T = 37 °C; vergl. Tab. 4.5.)

Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich konnte gezeigt werden, daß Ac-Aib-Gly-OH bzw. Ac-Aib-Gly-OBzl annähernd gleichschnell wie Ac-Aib-Ala-OH durch Trifluoressigsäure gespalten werden.

Im Gegensatz zu Ac-Aib-Ala-OH verläuft die trifluoracetolytische Spaltung des Ac-Ala-Aib-OMe(OH) unter denselben Bedingungen deutlich langsamer. Erst nach sechsstündiger Acidolysedauer sind mit TDM deutlich sichtbare Mengen abgespaltenen H-Aib-OMe nachweisbar.
Das Reagens färbt H-Aib-OMe sehr stark an. Dies ist bei der Abschätzung des Spaltverlaufes zu berücksichtigen (Abb. 4.5.1.)

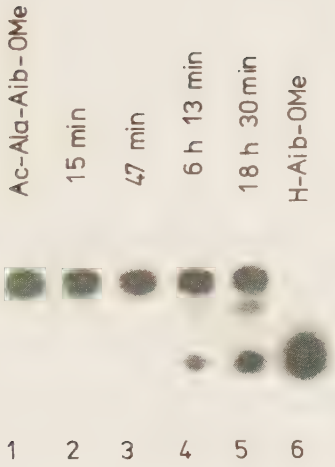


Abb. 4.5.1. Einwirkung von wasserfreier Trifluoressigsäure auf Ac-Ala-Aib-OMe
(c = 20 mmol/l, T = 37 °C), Anfärbung mit TDM

4.2.2.3. Selektive Abspaltung des Valinol von Modellpeptiden und von isolierten N-Prolylpeptiden des Trichotoxin A-40

Frühere Untersuchungen am Alamethicin hatten gezeigt, daß der in diesem enthaltene Aminoalkohol Phenylalaniol (vergl. Abb. 1.) unter relativ milden Bedingungen (wässriger HCl/Methanol/37 °C) abgespalten wird (13).
Versuche zur in Analogie ebenfalls anzunehmenden acidolytischen Abspaltbarkeit des Valinol vom Trichotoxin A-40 waren aus folgenden Gründen interessant:

1. war zu prüfen, ob Valinol auch mit Trifluoressigsäure vom Polypeptid abgespalten wird.
Wie an den Modellverbindungen H-Gln-Vol und CF_3COOH x H-Glu(Vol)-NH_2 gezeigt werden konnte, ist dies nicht der Fall. Auch bei der Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 wurde kein abgespaltenes Valinol gefunden. Es werden jedoch geringe Mengen des Dipeptides H-Gln-Vol vom Trichotoxin trifluoracetolytisch abgespalten (Abschn. 7.5.3.8.).

2. sollte versucht werden, durch Acidolyse der Modellsubstanzen Z-Gln-Vol und CF_3COOH x H-Glu(Vol)-NH_2 einen Hinweis auf die vermutete unterschiedliche acidolytische Sensitivität des α- bzw. γ-verknüpften Aminoalkohols zu finden und auf Trichotoxin zu übertragen (Tab. 4.6.).
Bei beiden Modellverbindungen wird jedoch der Alkohol durch eine Mischung von Dioxan/6 n HCl vollständig abgespalten. Der Beweis der α-Verknüpfung des Valinol wurde deshalb massenspektrometrisch geführt (Abschn. 3.4.).

3. führten diese Spaltversuche jedoch zur Erkenntnis, daß durch Mischungen von 6 n HCl/Dioxan bzw. 1.5 n HCl/Methanol der Aminoalkohol in den aus Trichotoxin A-40 isolierten Partialsequenzen H-Pro-Leu-Aib-Iva(Aib)-Gln-Vol selektiv abgespalten werden kann.
Damit war die Möglichkeit gegeben, die so erhaltenen Pentapeptide mit nunmehr freier Carboxylgruppe kovalent an den un-

Tab. 4.6. Untersuchungen zur acidolytischen Abspaltbarkeit des Valinol

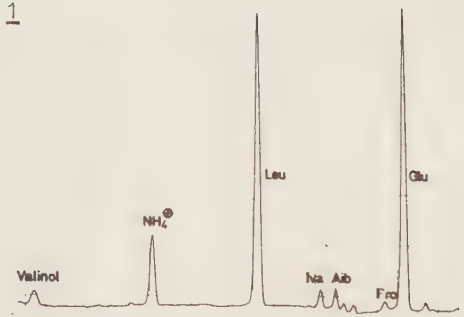
Verbindung	Spaltreagens	Temp. (°C)	Konz.	Spaltung	
CF_3COOH x H-Glu(Vol)-NH_2	Dioxan/6 n HCl (1:1, v/v)	37°	1%	+	Valinol nach 18 h 30 min vollständig abgespalten
Z-Gln-Vol	-"-	37°	1%	+	wie oben
CF_3COOH x H-Glu(Vol)-NH_2	CF_3COOH	60°	1%	-	Valinol auch nach 23 h 15 min nicht abgespalten, keine im DS sichtbare Veränderung
H-Gln-Vol	CF_3COOH	60°	1%	-	Valinol auch nach 23 h 15 min nicht abgespalten, Ausgangsmaterial jedoch vollständig in lipophilere Verbindungen ohne freie Aminogruppen umgewandelt
$^+H_2$-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol	Methanol/1.5 n HCl (1:1, v/v)	37°	0.5%	+	Valinol nach 3.5 h deutlich abgespalten, nach 20 h zu ca. 70 %
-"-	Dioxan/6 n HCl (1:1, v/v)	37°	0.5%	+	Valinol nach 43 h vollständig abgespalten
$^+H_2$-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol	-"-	37°		+	50 %ige Spaltung nach 11 h (Abb. 4.5.)

löslichen Träger 3-Aminopropyl-Glas zu knüpfen und anschließend einen Edman-Abbau an fester Phase durchzuführen (Abschn. 4.5.). Die Abspaltung des Valinol von aus Trichotoxin A-40 isoliertem H-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol konnte dünnschichtchromatographisch und quantitativ durch Bestimmung des freigesetzten Aminoalkohols auf dem Aminosäureanalysator verfolgt werden (Tab. 4.7. u. Abb. 4.5.).
Nach etwa 11 Stunden sind 50 % des Valinol abgespalten, selbst nach 67 stündiger Hydrolysedauer sind auf dem Aminosäureanalysator nur Spuren einer weitergehenden Hydrolyse feststellbar. Insbesondere macht an Stelle der Glutaminsäure erscheinende Peak auch nach dieser Zeit weniger als 5 mol% des Ausgangsmaterials aus. In Abb. 4.5. sind die weitaus geringeren Anfärbefaktoren von Pro, Aib, Iva und Valinol verglichen mit Glu und Leu zu berücksichtigen.

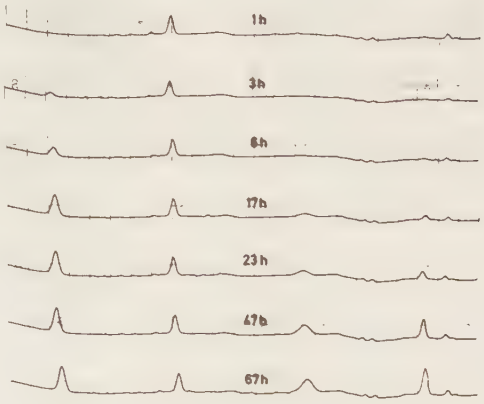
Tab. 4.7. Quantitative Bestimmung des aus H-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol durch 6 n HCl/Dioxan 1:1, v/v abgespaltenem Valinol. Der nach Totalhydrolyse des Peptids (6 n HCl/110 °C/ 18 h, vergl. Abb. 4.5.) ermittelte relative Flächenwert des Valinol wurde als 100 %ige Abspaltung angenommen.

Acidolysedauer (h)	Relative Fläche des Valinol (autom. Integration)	Anteil der Valinolfläche bezogen auf 100 %ige Spaltung (%)
1	0	0
3	918	11.4
6	2469	30.6
17	5953	73.8
23	6713	83.2
47	7120	88.3
67	7384	91.6
Totalhydrolyse	8060	100.0

1



2



3

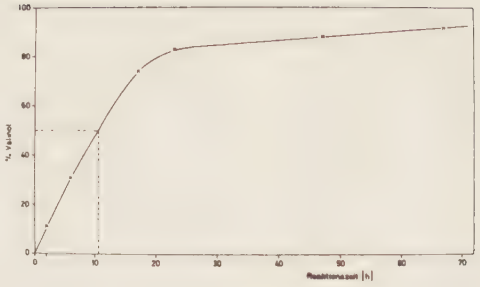


Abb. 4.5. Aminosäuregehalt des aus Trichotoxin A-40 isolierten N-Prolylpeptides H-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol nach Totalhydrolyse (6 n HCl/110 °C/18 h) = 1, quantitative Verfolgung der Valinol-Abspaltung des Peptides bei Acidolyse durch 6 n HCl/Dioxan 1:1, v/v (c = 6 mmol/l, T = 37 °C = 2 und Zunahme der Valinolfläche in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer = 3

Zusammenfassend lassen sich zur Säurelabilität der Modellverbindungen und des Trichotoxin folgende Aussagen machen:

1) Besonders säurelabil ist die Aib-Pro Bindung und zwar unabhängig davon, ob sich dieselbe am N-terminalen Ende oder in der Mitte des Moleküls befindet. Eine Spaltung wird jedoch verhindert oder zeitlich verzögert, wenn der dem Prolin benachbarte N-Terminus eine positive Ladung trägt.
Dies geht hervor aus der größeren Stabilität des durch Abspaltung der Boc-Gruppe aus Boc-Aib-Pro-NH-NH-Z erhaltenen CF_3COOH x H-Aib-Pro-NH-NH-Z verglichen mit dem N-acetylierten Amid. Auch vom synthetischen Nonadekapeptid Boc-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe wurde bei der Abspaltung der Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure/Dichlormethan 7:3 (ca. 30 min bei Raumtemperatur), das entsprechende Trifluoracetat in 92 %iger Ausbeute erhalten (110, 111). Einen Einfluß dürfte in diesem Fall auch die beobachtete drastische Verringerung der Spaltgeschwindigkeit in Mischungen aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan haben (vergl. Tab. 4.2.).
2) Desgleichen, wenn auch weniger rasch, wird in Modellsubstanzen und im Trichotoxin selbst die Ac-Aib-Gly- und Ac-Aib-Ala- Bindung auf der Carboxyl-Seite des Aib gespalten. Im Modell Ac-Ala-Aib-OMe ist die Spaltgeschwindigkeit stark vermindert.
3) Verhältnismäßig stabil ist die Aib-Ala-Bindung, wenn sie sich innerhalb einer längeren Peptidkette befindet.
4) Das Auffinden von Ac-Iva-OH neben Ac-Aib-OH bei der Trifluoracetolyse des Suzukacellin B (vergl. Abschn. 3.3.4.) spricht für ein dem Aib- analoges Verhalten von α-Dialkyl-α-aminosäuren ganz allgemein.
5) Über eine Peptidbindung mit Glutamin verknüpftes Valinol kann acidolytisch, z. B. durch 6 n HCl/Dioxan abgespalten werden.
6) Wie Trifluoressigsäure, aber mit veränderter Spaltgeschwindigkeit, verhalten sich Protonensäuren allgemein wie z.B. wässrige Lösungen von HCl sowie Mischungen dieser Lösungen mit Alkoholen und Essigsäure.

Das Verhalten der Modellsubstanzen gegen Acidolyse wird auch bei der Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 sowie seinen natürlichen Analoge beobachtet (Abschn. 4.2.1.).

4.3. Isolierung von Partialsequenzen nach Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40

Die in Abschn 4.2. dargelegten Untersuchungen hatten gezeigt, daß Trichotoxin A-40 insbesondere durch Trifluoressigsäure selektiv in Oligopeptide gespalten werden konnte (Abb. 4.1.). Eine ausgezeichnete dünnschichtchromatographische Trennung aller dabei erhaltenen Spaltprodukte war beim strichförmigen Auftragen auf Kieselgelplatten bei Verwendung des Fließmittelsystems Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig 65:25:4:3 möglich. Versuche zeigten, daß dieses System bei guter Trennleistung auch auf Kieselgel-Fertigsäulen übertragen werden konnte. Durch zweimalige Anwendung des säulenchromatographischen Verfahrens konnten das bei Trifluoracetolyse erhaltene Oligopeptidgemisch fraktioniert bzw. getrennt werden. Eine weitergehende Trennung wurde durch Anwendung der multiplikativen Gegenstromverteilung (69, 70) erreicht. In den so erhaltenen reinen Oligopeptiden wurde die Reihenfolge der Aminosäuren durch weitergehende Spaltung mit konzentrierter Salzsäure und anschließender GC-MS Analyse der entstandenen, nachfolgend trifluoracetylierten und methylveresterten Di-, Tri- und Tetrapeptide bestimmt (Abschn. 4.4.). Die Isolationen zweier Prolylpeptide und eines Undekapeptides mit jeweils freien N-terminalen Aminogruppen erlaubte zusätzlich die Durchführung des Edman-Abbaues an fester Phase (Abschn. 4.5.).

In den nachfolgenden Abbildungen sind schematisch die Methoden wiedergegeben, die zur Trennung und Isolierung der bei Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 erhaltenen Oligopeptide führten.

Abb. 4.6. Dünnschichtchromatographisches Bild der nach Trifluoracetolyse von 500 mg Trichotoxin A-40 (3 h 20 min/37 °C) und nachfolgender Chromatographie an einer Kieselgel-Fertigsäule im System Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig 65:25:4:3 (v/v) bei +7 °C erhaltenen Fraktionen. Gezeigt werden die bis zu einem Fraktionsvolumen von 675 ml erhaltenen Fraktionen (Fraktionen jeweils 15 ml), Anfärbung mit TDM. Fließmittel wie oben.

1 = Trichotoxin A-40 (Vergleichssubstanz, Ausgangsmaterial)
2 = Ac-Aib-OH (Vergleichssubstanz)

3 = Trichotoxin A-40 (trifluoracetolytisch nicht vollständig gespaltenes Ausgangsmaterial)
4 = Mischung dreier N-Acetyl-dodekapeptiden

5 = Ac-Aib-OH (aus Trichotoxin während Trifluoracetolyse abgespalten, Umkehr der Elutionsfolge bei der Säulenchromatographie)
6 = Prolylpeptid 2

7 = Prolylpeptid 1

8 = Undekapeptid

Die Fraktionen überlappen, angegeben sind die Hauptbestandteile. Nachfolgend und nahe am Start verbleibend wird abgespaltenes H-Ala-Aib-Aib-OH von der Säule eluiert; weitere Angaben vergl. Abschn. 7.

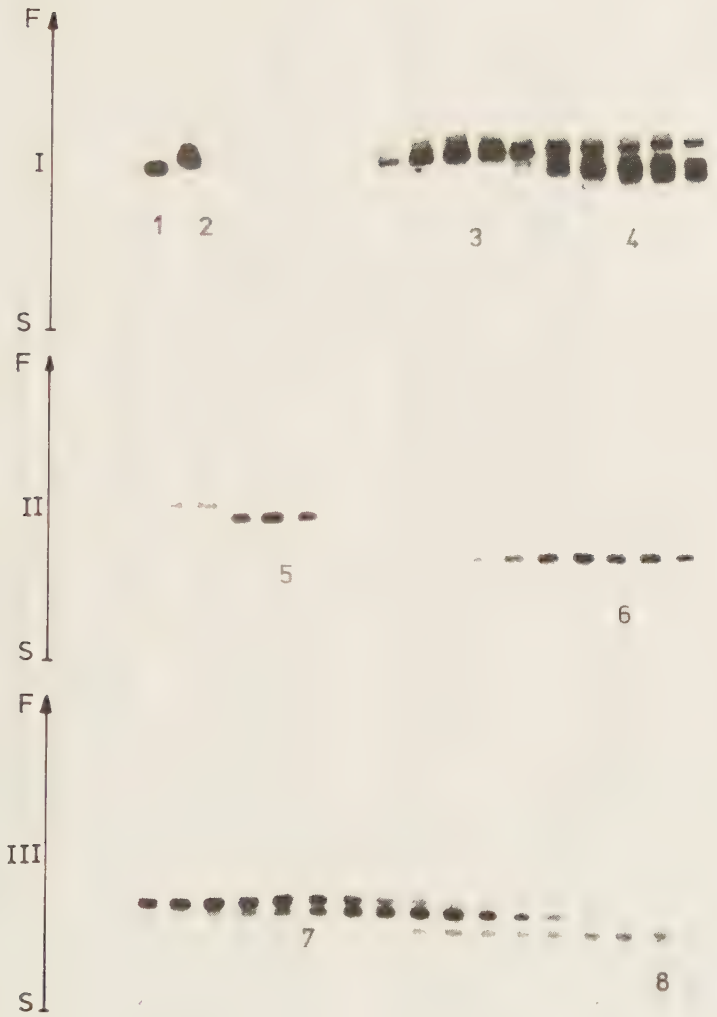


Abb. 4.6. Legende siehe vorhergehende Seite

(I, II, III = Nummer der Dünnschichtplatte, S = Start, F = Fließmittelfront)

Legenden zu den Abbildungen 4.7. bis 4.9.

Abb. 4.7. Schema der Isolierung, Spaltung und Partialsequenzen von Trichotoxin A-40
A,B,C,D = Multiplikative Gegenstromverteilung

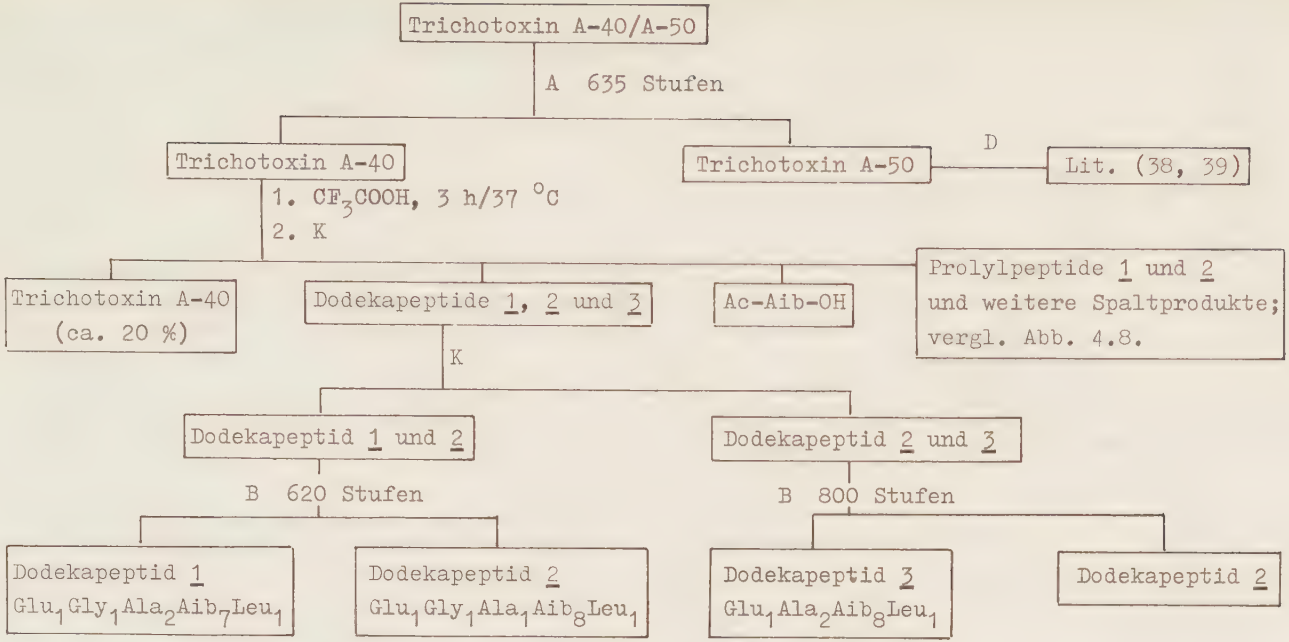
A = in 2-Butanol/0.015 m Ammoniumacetat (pH = 8.9), 1:1, v/v
B = in 2-Butanol/Essigester/Methanol/0.3 % Ammoniumacetat 3:5:2:3
C = in 1-Butanol/Essigester/Ammoniumacetat (pH = 4.6) 2:4.5:5
D = in Petrolether (Kp. 60-90 °C)/Essigester/Methanol/0.3 % Ammoniumacetat 4:14:3:6

K = Kieselgel-Säulenchromatographie bei +7 °C in Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig 65:25:4:3

Abb. 4.8. Schema der Isolierung zweier N-Prolylpeptide, eines Undekapeptides und eines Dipeptides nach Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40. Die Bezeichnungen entsprechen denjenigen in Abb. 4.7.

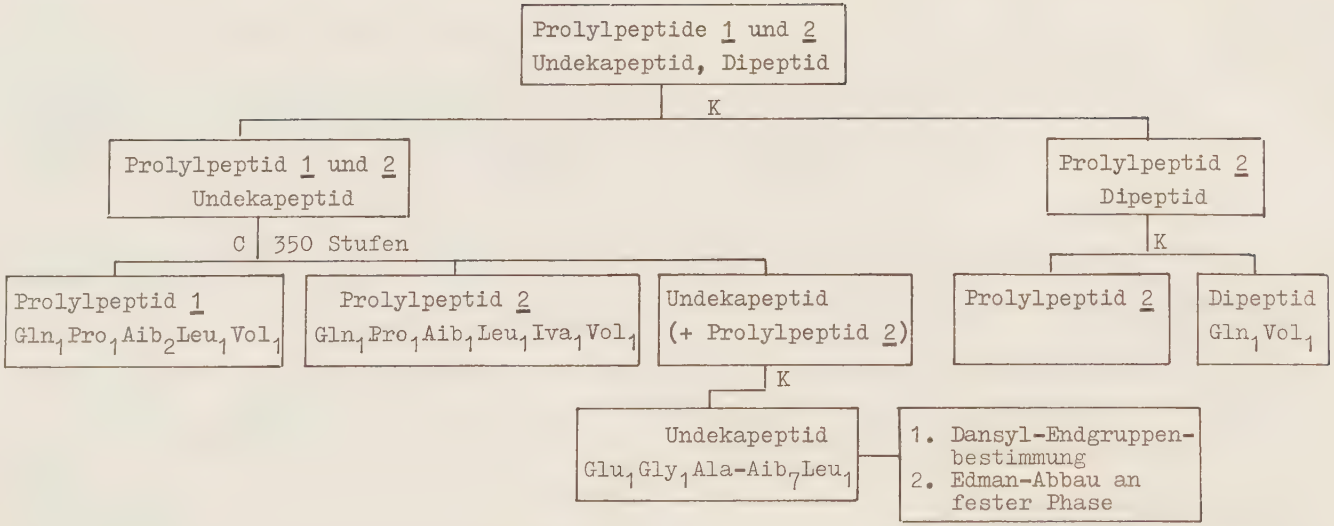
Abb. 4.9. Schema der Isolierung und Charakterisierung eines Undekapeptides, Oktapeptides und Tripeptides bei längerdauernder Trifluoracetolyse (19 h/37 °C) des Trichotoxin A-40.
Es wurde eine selektierte, mit Ninhydrin rot anfärbende Fraktion durch mehrfache Kieselgel-Säulenchromatographie weiter gereinigt.

K = Kieselgel-Säulenchromatographie, Bedingungen wie in Abb. 4.7. angegeben
(ml) = jeweiliges Fraktions-Volumen im System K
□ = Fraktionsnummer nach 50 ml, keine Peptide enthaltenden, Vorlaufes
$^{+}$ = aus Kenntnis der Sequenz sowie des Acidolyseverhaltens und der Aminosäureanalyse angenommen
GC-MS = Sequenz durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie ermittelt



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dodekapeptid 1 :	Ac-Aib-	Gly-	Aib-	Leu-	Aib-	Glu-	Aib-	Aib-	Ala-	Ala-	Aib-	Aib-OH
Dodekapeptid 2 :	Ac-Aib-	Gly-	Aib-	Leu-	Aib-	Glu-	Aib-	Aib-	Aib-	Ala-	Aib-	Aib-OH
Dodekapeptid 3 :	Ac-Aib-	Ala-	Aib-	Leu-	Aib-	Glu-	Aib-	Aib-	Aib-	Ala-	Aib-	Aib-OH

Abb. 4.7. Legende siehe vorhergehende Seite



13 14 15 16 17 18

Prolylpeptid 1: H-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Valol

Prolylpeptid 2: H-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Valol

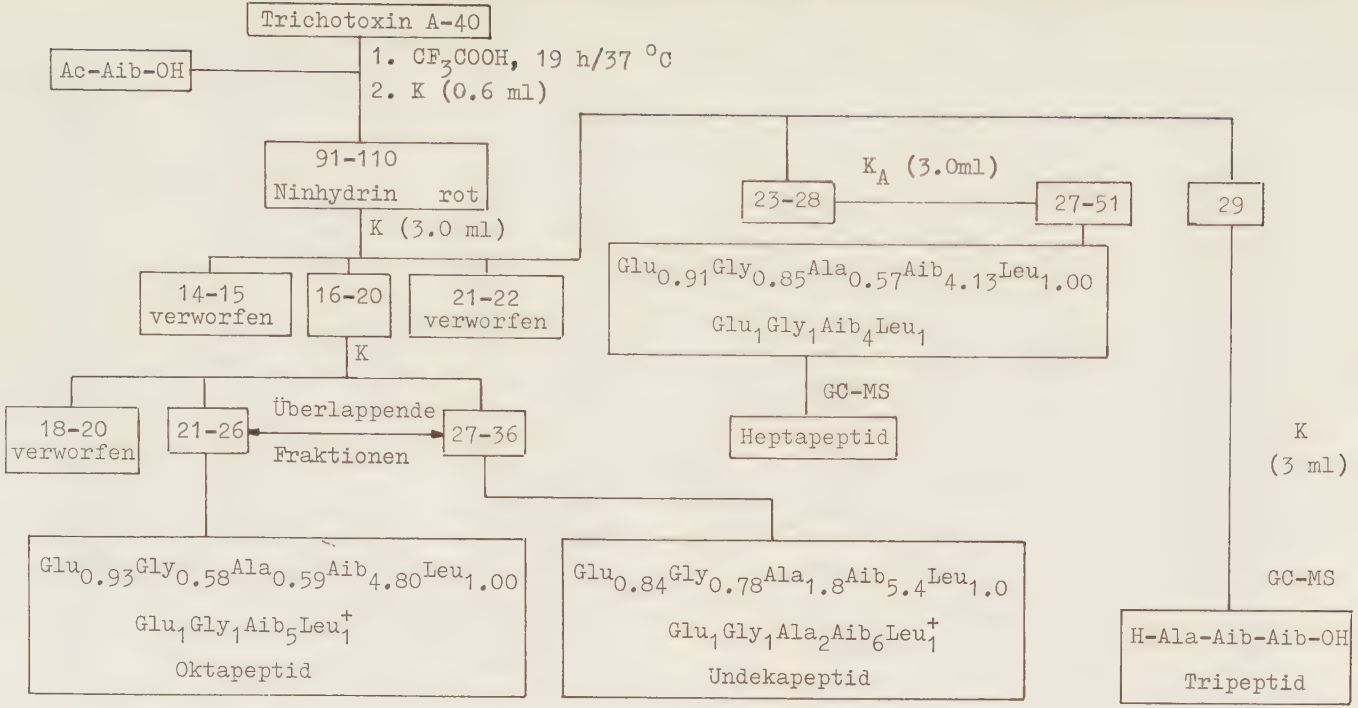
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Undekapeptid: H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

17 18

Dipeptid: H-Gln-Vol

Abb. 4.8. Legende siehe vorhergehende Seiten



Oktapeptid: H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-OH
Undekapeptid: H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-OH
Heptapeptid: H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-OH

Abb. 4.9. Legende siehe vorhergehende Seiten

Einige Aussagen über die Reihenfolge der Aminosäuren im Trichotoxin A-40 konnten durch die in den vorhergehenden Abschnitten dargelegten Untersuchungen und Isolierungen gemacht werden, bevor mit den weiteren GC-MS Untersuchungen isolierter Partialsequenzen begonnen wurde.
Aus der quali- und quantitativen Aminosäureanalyse ergab sich die Aminosäurezusammensetzung. Eine beobachtete Nichtstöchiometrie und ein deshalb vermuteter Sequenzaustausch konnte durch die Aminosäureanalyse von isolierten Partialsequenzen bestätigt und in bestimmten Bereichen lokalisiert werden.
Das trifluoracetolytische Spaltverhalten des Trichotoxin A-40 war unter Berücksichtigung des Verhaltens von Modellsubstanzen erklärbar. Das Peptidantibiotikum wird bevorzugt in drei sequenzanaloge N-Acetyldodekapeptide und zwei N-Prolylpeptide gespalten. Der C-Terminus der N-Prolylpeptide, und damit auch des Trichotoxin A-40 selbst, wird durch Gln-Vol gebildet.
Eine geringfügige trifluoracetolytische Abspaltung dieses Dipeptides vom Trichotoxin bzw. den N-Prolylpeptiden lässt sich nachweisen.
Die N-Acetyldodekapeptide bilden den N-terminalen Bereich des Trichotoxin A-40. Bei längerdauernder Trifluoracetolyse wird von dem betreffenden N-Acetyldodekapeptid das Tripeptid Ala_1Aib_2 C-terminal abgespalten.
Kinetisch bevorzugt ist jedoch die Abspaltung des Ac-Aib-OH von den N-Acetyldodekapeptiden. Man erhält Undekapeptide, von denen eines isoliert wurde.
Der Isolierung desselben kam insofern eine Schlüsselrolle zu, da daraus verschiedene strukturelle Aussagen abgeleitet werden konnten, auf die deshalb an dieser Stelle hingewiesen sei:

1. Durch Dansylierung wurde Glycin als N-terminale Aminosäure des Undekapeptides nachgewiesen. Dadurch war die Reihenfolge einiger duch GC-MS gefundener Partialsequenzen eindeutig festzulegen (Abb. 4.10. und Tab. 4.8.).

2. Durch Trifluoracetolyse eines isolierten N-acetylierten Dodekapeptides wurde das eben erwähnte Undekapeptid sowie

Ac-Aib-OH erhalten. Damit war an einem größeren Peptid bestätigt, daß nicht nur Aib-Pro Bindungen im Peptidverband oder N-terminale Ac-Aib-Pro Bindungen durch Trifluoressigsäure gespalten werden, sondern Ac-Aib-Aminosäure Bindungen allgemein

3. Ein Edman-Abbau an fester Phase bestätigte die durch GC-MS Untersuchungen ermittelte Sequenz (Abschn. 4.5.)

4. CD-Messungen zeigten das Vorliegen einer helikalen Struktur des Undekapeptides (Abschn. 5.1.)

Unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen konnten die in Abb. 4.10. gezeigten Strukturaussagen gemacht werden.

4.4. Sequenzierung isolierter Fragmente aus Trichotoxin A-40 durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie[+]

Die Reihenfolge der Aminosäuren in den aus Trichotoxin A-40 erhaltenen, und wie in Abschn. 4.3. beschrieben isolierten Fragmenten, wurde durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie ermittelt (112). Diese Methode hatte sich bei der Sequenzierung anderer Peptidantibiotika bewährt (5, 113, 114) und wurde auch aus den in Abschn. 4.1. dargelegten Gründen gewählt.
Zur Sequenzierung wurden die erhaltenen Fragmente durch Einwirkung von Säure in ein Gemisch von Peptiden verschiedener Kettenlänge zerlegt. Die nachfolgende Veresterung und Trifluoracetylierung wurde nach der Methode von F. WEYGAND et. al. durchgeführt (115). Die auf diese Weise erhaltene Mischung

---

[+]Sehr herzlich sei an dieser Stelle Herrn Prof. W. A. König und seinen Mitarbeitern, den Herren M. Greiner, H. Krohn und K. Kruse, Universität Hamburg, für diese Untersuchungen sowie die ausgezeichnete Zusammenarbeit gedankt.

Trichotoxin A-40

$Glu_2Pro_1Gly_{1(0)}Ala_{2(1)}Aib_{8(9,10)}Iva_{1(0)}Leu_2Vol_1$; Σ = 18 Aminosäuren$^+$

Berücksichtigung von I und II

1) Selektive Spaltung
2) Trennung der Partialsequenzen
3) Quantitative Aminosäureanalyse
   Bestimmung funktioneller Endgruppen

I **N-Terminus:** N-Acetyldodekapeptide

1 2 3-9 10-12

$Ac\text{-}Aib\text{-}Gly_{1(0)}\text{-}\left[(Glu_1Ala_{1(0)}Aib_{6(5)}Leu_1)\text{-}(Ala_1Aib_2)\right]\text{-}OH$

Σ = 12 Aminosäuren

2

Austausch: Gly ↔ Ala

3-9

Aib ↔ Ala

II **C-Terminus:** Prolylpeptide

13 14-16 17 18

$H\text{-}Pro\text{-}\left[Aib_{1(2)}Iva_{1(0)}Leu_1\right]\text{-}Gln\text{-}Vol$

Σ = 6 Aminosäuren$^+$

Austausch: Iva ↔ Aib

Abb. 4.10. Schematische Zusammenfassung der Strukturaussagen, die sich aus den quantitativen Aminosäureanalysen isolierter Oligopeptide, Endgruppenbestimmungen und acidolytischem Spaltverhalten des Trichotoxin A-40 ergeben.

Tiefgestellte Zahlen geben die Aminosäurestöchiometrie unter Berücksichtigung ausgetauschter Aminosäuren an.

$^+$Valinol wurde als Aminosäure gerechnet

relativ leichtflüchtiger N,O-acylierter Peptidester wurde gaschromatographisch getrennt und durch ein direkt mit dem Gaschromatographen gekoppeltes Massenspektrometer untersucht (116). Zur Elektronenstoßionisation (EI) fand ergänzend die Chemische Ionisation (CI) Anwendung, da dadurch die Interpretation der Spektren infolge der schonenden Fragmentierung und des starken Auftretens des betreffenden Molekülions $(MH)^+$ erleichtert wird (117). In den folgenden Abbildungen werden Beispiele für die gaschromatographische Trennung derivatisierter Partialsequenzen (Abb. 4.11.) sowie EI und CI Massenspektren (Abb. 4.12.) gezeigt.
Die Ergebnisse der GC-MS Untersuchungen bezüglich der Überlappung der Partialsequenzen, zusammen mit den quantitativen Aminosäureanalysen sind in den Tabellen 4.8. dargestellt. Unter Berücksichtigung dieser GC-MS Untersuchungen, von Endgruppen- und Konfigurationsbestimmungen sowie des acidolytischen Spaltverhaltens lässt sich die Sequenz des Trichotoxin A-40 wie in Abb. 4.13 gezeigt darstellen.

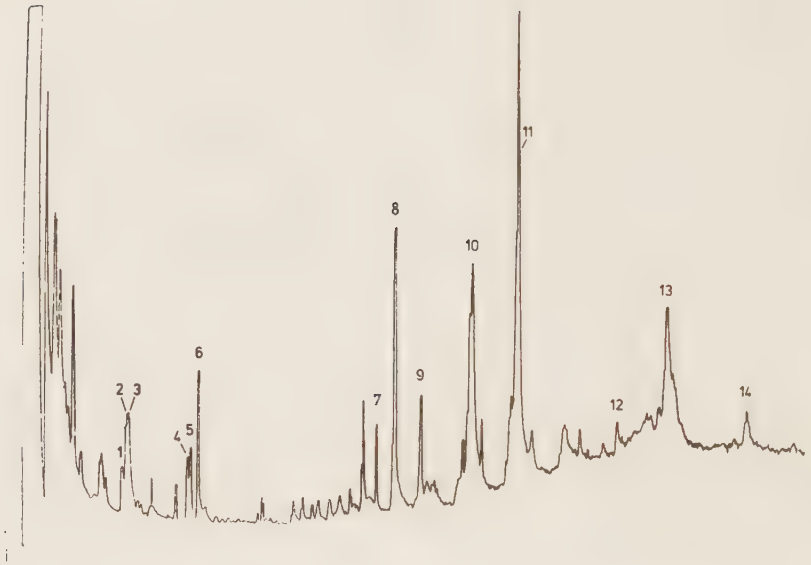


Abb. 4.11. Gaschromatographische Trennung einer Mischung von N-Trifluoracetyl-peptid-methylester, erhalten durch Hydrolyse eines aus Trichotoxin A-40 isolierten Heptapeptides (vergl. Abb. 4.9.) mit 12 n wässriger HCl (24 h/37 °C), Veresterung mit 1.5 n HCl in Methanol und nachfolgender Trifluoracetylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid. Gaschromatographische Bedingungen: vergl. Abb. 4.12.

(1) Tfa-Aib-Aib-OMe, (2) Tfa-Ala-Aib-OMe, (3) Tfa-Gly-Aib-OMe, (4) Glu-Aib (cyclisierte Verbindung), (5) Tfa-Leu-Aib-OMe, (6) Tfa-Aib-Leu-OMe, (7) Palmitinsäuremethylester (Verunreinigung), (8) Aib-Aib (vermutlich cyclisierte Verbindung), (9) Tfa-Aib-Leu-Aib-OMe, (10) Tfa-Gly-Aib-Leu-OMe, (11) Tfa-Glu-Aib-Aib-OMe, (12) Tfa-Aib-Glu-Aib-OMe, (13) Tfa-Gly-Aib-Leu-Aib-OMe, (14) Tfa-Aib-Glu-Aib-Aib-OMe

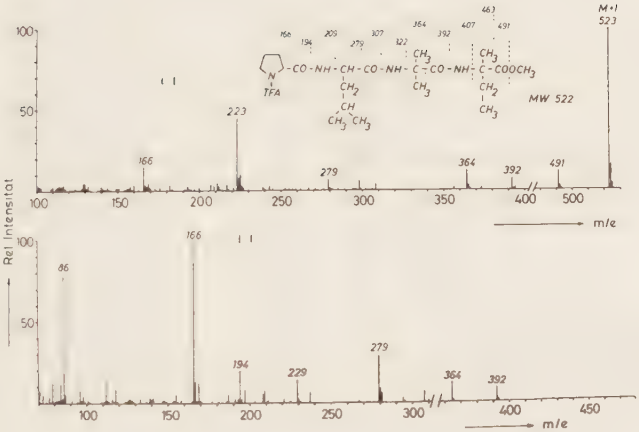


Abb. 4.12. CI (Isobutan)- und EI (70 eV)-Massenspektren nach gaschromatographischer Trennung von N-Trifluoracetyl-L-prolyl-L-leucyl-α-aminoisobutyryl-D-isovalin-methylester (Tfa-L-Pro-L-Leu-Aib-D-Iva-OMe). Die Verbindung wurde erhalten durch Hydrolyse und nachfolgender Derivatisierung (Bedingungen vergl. Abb. 4.11.) von aus Trichotoxin A-40 isoliertem L-Prolyl-L-leucyl-α-aminoisobutyryl-D-isovalyl-L-valinol (H-L-Pro-L-Leu-Aib-D-Iva-L-Gln-L-Vol, Prolylpeptid 2 in Abb. 4.8.).
Bedingungen: Gaschromatographie auf einer 25 m Glaskapillarsäule beschichtet mit SE 30, Trägergas He, Druck 0.5 bar, offene Kopplung mit einem Varian MAT 311 A Massenspektrometer, Ionenquellentemperatur 200 °C

Tab. 4.8. Übersicht über die Ergebnisse der Sequenzierung isolierter Fragmente aus Trichotoxin A-40[+]

4.8.1. Glu(1.05); Gly(0.91); Ala(1.14); Aib(7.65); Leu(1.0)
Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib

4.8.2. Glu(1.01); Gly(0.97); Ala(2.03); Aib(6.93); Leu(1.0); Iva(0.35)
Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib

4.8.3. Glu(0.97); Gly(0.12); Ala(1.82); Aib(7.81); Leu(1.0); Iva(0.49)
Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib

4.8.4. Glu(0.9); Gly(0.9); Ala(0.6); Aib(4.0); Leu(1.0); Iva(0.3)
Gly-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib

4.8.5. Glu(0.88); Pro(1.07); Aib(0.96); Leu(1.00); Vol(1.34); Iva(1.46)
Pro-Leu-Aib-Iva-Glx-Vol

4.8.6. Glu(0.81); Pro(1.06); Aib(1.81); Leu(1.00); Vol(1.29); Iva(0.40)
Pro-Leu-Aib-Aib-Glx-Vol

Ala(1.0); Aib(2.0);
Ala-Aib-Aib

[+]Ac-Aib-OH wird unter den Bedingungen der GC-MS-Sequenzierung in den Verbindungen 4.8.1. - 4.8.3. nicht gefunden, die Bestimmung erfolgte durch quantitative Aminosäureanalyse sowie durch die in Abschn. 3.3. geführten Nachweise. Die Werte für Iva und Vol sind nicht korrigiert. Iva als Bestandteil der Sequenz wurde nur im Peptid 4.8.5. nachgewiesen; zur Diskussion des Isovalin vortäuschenden Untergrundes vergl. Fußnote Abschn. 3.1.2.
Vol wird durch den verwendeten Test um ca. 30 % zu hoch gefunden; vergl. Abschn. 7.2.

Tab. 4.8.1.

Gly-Aib
Gly-Aib-Leu
Gly-Aib-Leu-Aib
Aib-Leu
Aib-Leu-Aib
Aib-Glu
Aib-Glu-Aib
Aib-Glu-Aib-Aib
Glu-Aib-Aib
Glu-Aib-Aib-Aib
Aib-Aib
Aib-Aib-Aib
Aib-Ala
Aib-Ala-Aib
Aib-Ala-Aib-Aib

Gly-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib

Tab. 4.8.2.

Gly-Aib
Gly-Aib-Leu
Gly-Aib-Leu-Aib
Aib-Leu
Aib-Leu-Aib
Leu-Aib
Aib-Glu-Aib
Aib-Glu-Aib-Aib
Glu-Aib-Aib
Aib-Aib
Aib-Ala
Ala-Ala
Ala-Ala-Aib
Ala-Ala-Aib-Aib
Ala-Aib
Ala-Aib-Aib

Gly-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib

Tab. 4.8.3.

```
Ala-Aib
Ala-Aib-Leu
Ala-Aib-Lau-Aib
    Aib-Leu
    Aib-Leu-Aib
            Aib-Glu
            Aib-Glu-Aib
            Aib-Glu-Aib-Aib
                Glu-Aib-Aib
                Glu-Aib-Aib-Aib
                    Aib-Aib
                    Aib-Aib-Aib
                            Aib-Ala
                            Aib-Ala-Aib
                            Aib-Ala-Aib-Aib

Ala-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib
```

Tab. 4.8.4.

```
Gly-Aib
Gly-Aib-Leu
Gly-Aib-Leu-Aib
    Aib-Leu
    Aib-Leu-Aib
        Leu-Aib
            Aib-Glu
            Aib-Glu-Aib
            Aib-Glu-Aib-Aib
                Glu-Aib-Aib
                    Aib-Aib

Gly-Aib-Leu-Aib-Glx-Aib-Aib
```

Tab. 4.8.5.

Pro-Leu
Pro-Leu-Aib
Pro-Leu-Aib-Iva
Leu-Aib
Leu-Aib-Iva
Iva-Glu
Glu-Vol

Pro-Leu-Aib-Iva-Glx-Vol

Tab. 4.8.6.

Pro-Leu
Pro-Leu-Aib
Pro-Leu-Aib-Aib
Leu-Aib
Leu-Aib-Aib
Aib-Glu
Glu-Vol

Pro-Leu-Aib-Aib-Glx-Vol

Die aus den Partialsequenzen erhaltene Gesamtsequenz des Trichotoxin A-40 unter Berücksichtigung des Acidolyseverhaltens und der Mikroheterogenität zeigt Abb. 4.13.

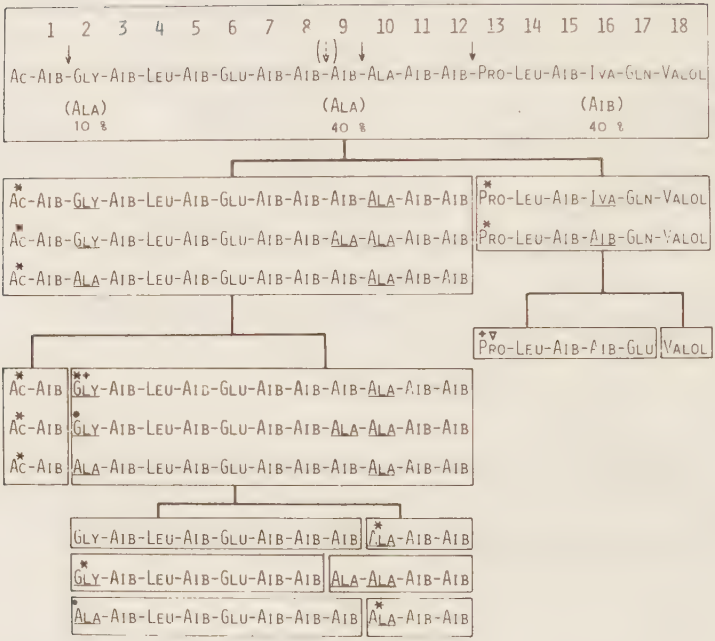


Abb. 4.13. Sequenz des Trichotoxin A-40 und daraus durch selektive Acidolyse erhaltene Fragmente

* Verbindungen nach Trifluoracetolyse isoliert und durch GC-MS Untersuchungen sequenziert

+ Durch Edman-Abbau an fester Phase via Phenylthiohydantoin-Derivate sequenziert

▽ Erhalten durch selektive Acidolyse mit Dioxan/6 n HCl

● Vermutlich identisch mit den in Abb. 4.9. charakterisierten Peptiden

↓ Pfeile geben die bevorzugten Spaltstellen bei der Trifluoracetolyse an, die Reihenfolge der Spaltung ist

12-13 > 1-2 > 9-10 bzw. 8-9.

Der Prozentsatz des Aminosäureaustausches wurde durch die Menge der isolierten Peptide sowie dünnschichtchromatographisch abgeschätzt.

4.5. Edman-Abbau an fester Phase von α-Aminoisobutyryl-Modellpeptiden und Partialsequenzen des Trichotoxin A-40[+]

Ergänzend zu den GC-MS Untersuchungen zur Primärstruktur des Trichotoxin A-40 wurden Sequenzierungsversuche mit einer zweite zweiten, unabhängigen Methode unternommen. PAYNE, JAKES und HARTLEY hatten bei der Sequenzierung des Alamethicin den sog. "Dansyl"-Edman-Abbau von Partialhydrolysaten angewandt (10, 118, 119). Dabei wird die N-terminale Aminosäure eines Peptides mittels Phenylisothiocyanat in das entsprechende Phenylthiocarbamoylpeptid übergeführt und dieses acidolytisch zum Thiazolinon cyclisiert, wobei die N-terminale Aminosäure unter Freisetzung eines neuen, um eine Aminosäure verkürzten Restpeptides abgespalten wird. Der N-Terminus desselben kann durch 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-chlorid (Dansylchlorid) in das entsprechende Dansylderivat übergeführt und nach acidolytischer Abspaltung als Dansylaminosäure durch Chromatographie auf Polyamid-Folien identifiziert werden. Bei der nach dieser Methode von obigen Autoren am Alamethicin durchgeführten Sequenzierung wurden häufig eine unvollständige Abspaltung N-terminaler α-Aminoisobuttersäure beim Edman-Abbau sowie niedere Ausbeuten an Dansyl-α-aminoisobuttersäure beobachtet. Erklärt wird dies durch unvollständige Reaktion der N-terminalen α-Aminoisobuttersäure mit Dansylchlorid infolge sterischer Hinderung. Diese wird ebenfalls als Ursache für die unvollständige Reaktion der N-terminalen α-Aminoisobuttersäure mit Phenylisothiocyanat und Schwierigkeiten bei der Cyclisierung und Abspaltung der N-terminalen Phenylthiocarbamoyl-α-aminoisobuttersäure angenommen. Beim Alamethicin konnten deshalb in keinem Fall mehr als vier Abbaustufen sicher interpretiert werden. Erfolgversprechend zum Abbau längerer Sequenzen schien uns jedoch eine als Solid-phase-Edman-Abbau bezeichnete Methode. Das Peptid wird hierbei im allgemeinen C-terminal kovalent an einen unlöslichen festen

---

[+]Herrn Dr. E. Wachter, Universität München, sei für diese Untersuchungen recht herzlich gedankt.

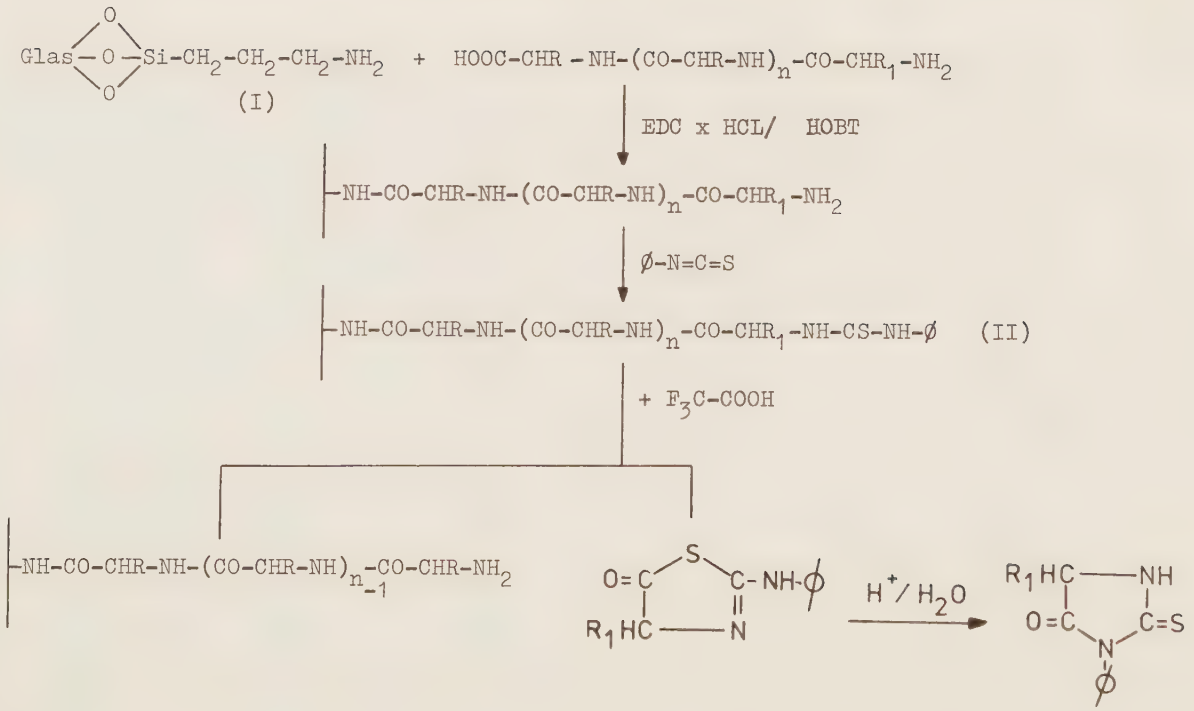


Abb. 4.14. Schema des Edman-Abbaues eines Peptides an einem festen Träger (Solid-phase-Edman-Abbau).
Ø = Phenyl, R = Aminosäure-Seitenkette, sonstige Bezeichnungen vergl. Text.

Träger (Aminopolystyrol- und Polyacrylharze oder aminoalkylsilylierte, poröse Glasträger) gebunden und anschließend schrittweise abgebaut (120-125). Dabei werden insbesondere die beim manuellen bzw. Liquid-phase-Edman-Abbau auftretenden Verluste durch Extraktion des Restpeptides zusammen mit den PTH-Aminosäuren ins lipophile Lösungsmittel vermieden (103). Durch die Automatisierung der Methode sollten zudem rasche Variationen und Optimierungen der Abbaubedingungen möglich sein. Die abgespaltenen PTH-Aminosäuren wurden im vorliegenden Falle durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie identifiziert. Die Identifizierung kann jedoch prinzipiell auch auf andere Weise wie Dünnschichtchromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Totalhydrolyse und Identifizierung der entstehenden Aminosäuren u. a. erfolgen (125).
Ein direkter Solid-phase-Edman-Abbau am Trichotoxin A-40 war nicht möglich, da dessen N-terminale Aminosäure durch eine Acetylgruppe und die C-terminale durch das peptidisch gebundene Valinol blockiert sind. Nach der selektiven Trifluoracetolyse des Trichotoxin konnte jedoch ein Undekapeptid mit freiem N-terminalen Glycin und freiem C-Terminus isoliert werden (Abschn. 7.5.3.7.), welches die Anforderungen des Solid-phase-Edman-Abbaues erfüllte. Aus einem C-terminalen Prolylpeptid (Abschn. 4.3.) konnte der Aminoalkohol selektiv abgespalten (Tab. 4.6.) und die freiwerdende Carboxylgruppe mit dem festen Träger verknüpft werden. Als Modellsustanzen standen ferner synthetische, Aib-haltige Peptide (110, 111) zur Verfügung, an denen die Abbaumethodik erprobt und optimiert werden konnte.

Modellpeptide und Trichotoxinfragmente wurden im vorliegenden Falle C-terminal unter Verwendung von N-Dimethyl-aminopropyl-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC x HCl) und Hydroxybenzotriazol (HOBT) an 3-Aminopropyl-Glas (I) gebunden (Abb. 4.14.). Der stufenweise Edman-Abbau erfolgte nach Umsetzen mit Phenylisothiocyanat zum Phenylthiocarbamoylpeptid (II) und Trifluoressigsäure als Cyclisierungs- und Abspaltungsreagens. Da die Trichotoxinfragmente durch dreistündige Trifluoracetolyse

bei 37 °C erhalten worden waren, sollten keine besonders labilen Peptidbindungen mehr vorhanden sein, die den Abbau gleich zu Beginn stören würden.

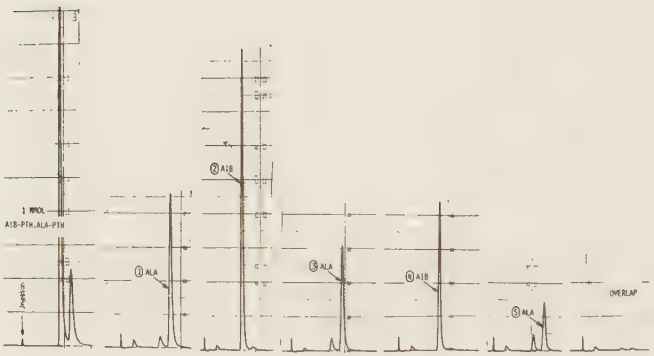


Abb. 4.15. Gaschromatogramm der PTH-Aminosäuren nach Solid-phase-Edman-Abbau des Modell-Pantapeptides
H-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH
(beachte das Response-Verhältnis für PTH-Aib und PTH-Ala).

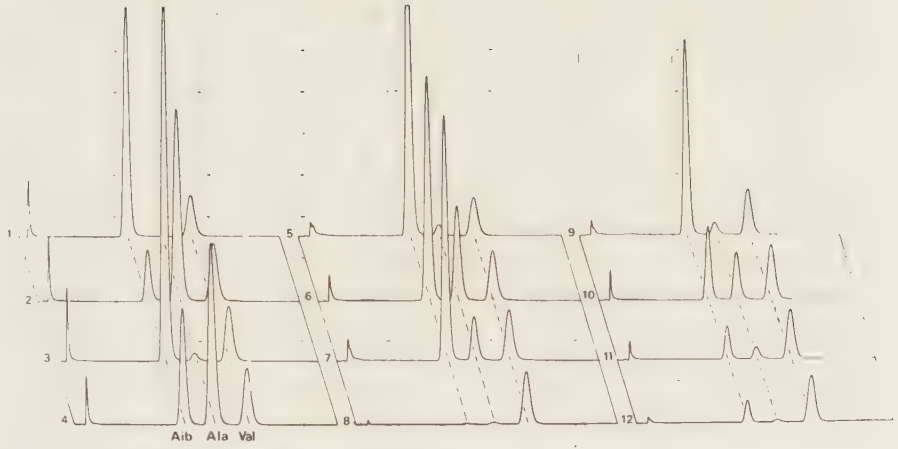


Abb. 4.16. Gaschromatogramm der PTH-Aminosäuren nach Solid-phase-Edman-Abbau des Modell-Dekapeptides H-(Aib-Ala)$_5$-OH. Als innerer Standard wurde PTH-Val zugesetzt. In 8 ist nur PTH-Val deutlich zu sehen, da in diesem Versuch nur ca. 5 % des sonst eingesetzten Probevolumens eingespritzt wurde. Es ist jedoch zu erkennen, daß die Fläche des PTH-Ala größer ist als die des PTH-Aib. 11 und 12 = Überlappung.

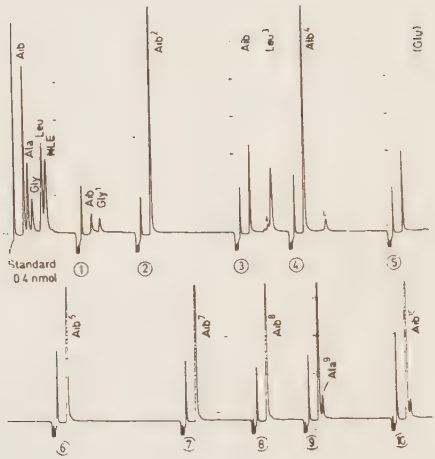


Abb. 4.17. Gaschromatogramm der PTH-Aminosäuren nach Solid-phase-Edman-Abbau des aus Trichotoxin A-40 isolierten Undekapeptides H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-OH.

Aib^{11} bleibt am festen Träger, PTH-Glu^{5} gibt nur einen sehr kleinen Peak im GC, kann jedoch massenspektrometrisch identifiziert werden.
Der erste im GC erscheinende Peak ist jeweils Leucin-methylthiohydantion (MTH-Leu) als interner Standard; NLE = Norleucin, nur in der Standardmischung enthalten.

Der in analoger Weise durchgeführte Solid-phase-Edman-Abbau des Prolylpeptides 1 ergab nach vorhergehender selektiver Valinol-Abspaltung die Sequenz H-Pro-Leu-Aib-Aib-OH (hier nicht abgebildet).
Diese Methode bestätigte die durch GC-MS-Sequenzierung ermittelte Reihenfolge der Aminosäuren im Trichotoxin A-40.

5. Konformationsuntersuchungen und membranmodifizierende Wirkungen

5.1. Circulardichroismus

Die Messung des Circulardichroismus (CD) zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen geht auf Arbeiten von DJERASSI, CRABBE, JIRGENSONS u. a. zurück (126-129). Gemessen wird hierbei die unterschiedliche Absorption von links- und rechtscircular polarisiertem Licht<250 nm. Diese wird verursacht durch die asymetrische Umgebung des Carbonylchromophors der Peptidbindung und durch die Sekundärstruktur des Moleküls welche, wie im Falle der rechts- oder linksgängigen Helix selbst, eine chirale Konformation darstellt. Das negative CD-Maximum bei 221 nm wird durch den $n\pi^+$ - Übergang verursacht, während das negative Maximum bei 207 nm und das positive Maximum bei 190 nm jeweils einem $\pi\pi^+$ - Übergang zugeschrieben werden. Das Auftreten von Cotton - Effekten mit entgegengesetztem Vorzeichen im Spektralbereich von 190 - 210 nm (excition splitting) sind Hinweise auf α-helikale Konformationen, wie sie bei poly-L-Glutaminsäure und poly-L-Lysin angenommen werden (130). Ausführliche CD-Messungen an Alamethicin (131, 132), Suzukacillin (5) und Trichotoxin (16, 37) sowie synthetischen Aib-haltigen Peptiden sprechen für das Vorliegen helikaler Strukturen bei diesen Peptiden. Diese werden auch durch ^{13}C-NMR-Messungen sowie FIR- und IR-Untersuchungen bestätigt (17, 133-138). Die Gewinnung genügender Mengen Trichotoxin A-40 boten die Möglichkeit, sowohl durch Derivatisierung als auch selektive Spaltung und Isolierung der Spaltprodukte circulardichroitische Untersuchungen vorzunehmen (Abb. 5.1.).

Aufgrund der in dieser gezeigten CD-Spektren können folgende qualitative Aussagen gemacht werden:

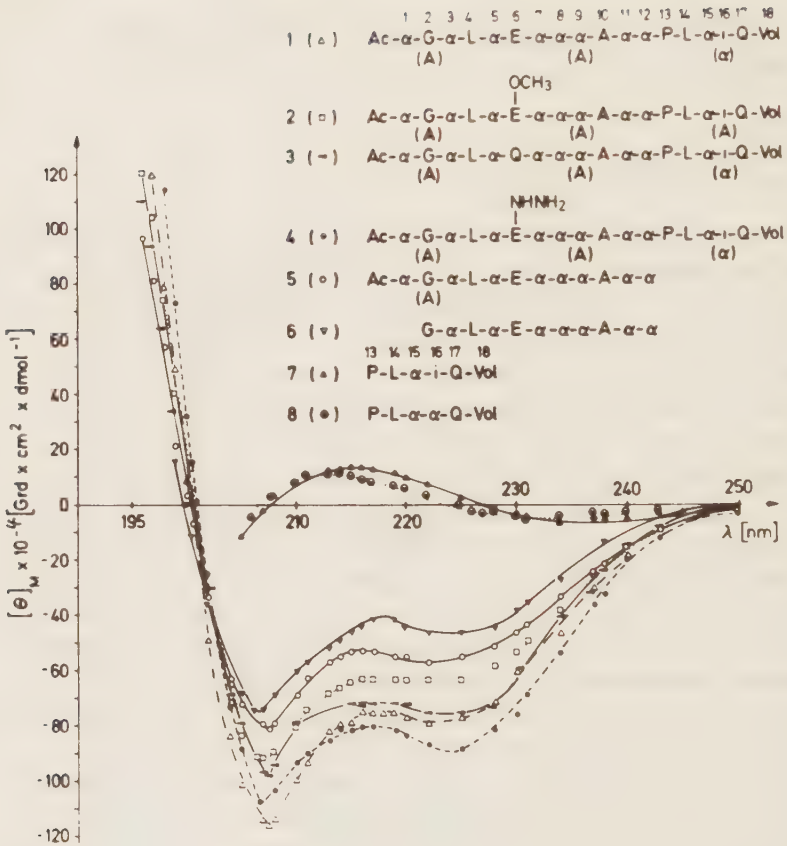


Abb. 5.1. Circulardichroismus-Spektren von Tichotoxin A-40 = 1, dessen Methylester = 2, Säureamid = 3 und Hydrazid = 4, und den aus Trichotoxin A-40 nach selektiver Trifluoracetolyse isolierten Partialsequenzen N-Acetyldodekapeptid = 5, Undekapeptid = 6 und zwei Prolylpeptiden 7 und 8. Bedingungen: c = 5 x 10^{-4} mol/l in Methanol, T = 25 °C.

(Ac = Acetyl, α = Aib, i = Iva, Vol = Valinol; ansonsten Abkürzungen nach Biochemistry (1968) 7, 2703).

1) Trichotoxin A-40 und seine Derivate (Ester, Amid, Hydrazid), sowie seine N-terminalen Spaltprodukte (N-acyliertes Dodekapeptid und daraus durch Ac-Aib-OH Abspaltung erhaltenes Undekapeptid) zeichnen sich durch negative Cotton - Effekte bei 221 nm und 207 nm aus. Diese CD-Kurven sind charakteristisch für helikale Strukturen.

2) Die Derivatisierung der Glutaminsäure-Carboxy-Gruppe des Trichotoxin A-40 hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Helixgehalt.

3) Das durch selektive Spaltung gewonnene und isolierte N-Acetyldodekapeptid und Undekapeptid mit freier Aminogruppe ergeben einen Kurvenverlauf ähnlich dem Trichotoxin A-40 mit vermindertem Helixgehalt. Völlig anders ist der Kurvenverlauf für die beiden sequenzanalogen Prolylpeptide. Es ist charakteristisch für ungeordnete (random coil) Strukturen.

4) Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit zwischen den CD-Spektren der aus Trichotoxin A-40 isolierten Fragmenten und denjenigen von synthetischen, Aib-haltigen Modellpeptiden:
Das CD-Spektrum des Undekapeptides ist demjenigen des synthetischen Dodekapeptides Boc-(L-Ala-Aib-)$_5$OH sehr ähnlich. Die Spektren der Prolylpeptide H-Pro-Leu-Aib-Iva(Aib)-Gln-Vol zeigen nahezu dieselben CD-Kurven wie das synthetische Hexapeptid Boc-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (138).

Als Modell für Trichotoxin A-40 (und ähnlich für seine natürlichen Analoga Suzukacillin und Alamethicin) ist demnach eine Konformation anzunehmen, die durch einen helikalen, etwa 10 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Teil und einen mit Prolin beginnenden, im wesentlichen in ungeordneter Struktur vorliegenden, C-terminalen Teil gebildet wird. Bei der Abspaltung von Ac-Aib-OH bleibt die helikale Struktur des N-Terminus erhalten. Im Vorgriff auf Ergebnisse der folgenden ^{13}C-NMR-Untersuchungen (Abschn. 5.2.) sei erwähnt, daß der acylierte N-Terminus des helikalen Molekülteiles sehr wahrscheinlich

einen diesen stabilisierenden ß-Turn ausbilden kann (139-141).

Alle CD-Untersuchungen zeigen zwar übereinstimmend und eindeutig das Vorliegen einer helikalen Struktur in Peptidantibiotika vom Alamethicin - Typ, (d.h. Suzukacillin und Trichotoxin), über die Art der vorliegenden Helix kann bislang durch CD-Untersuchungen alleine, auch unter Berücksichtigung von ^{13}C-NMR und anderen Daten, keine Aussage gemacht werden.

In Frage kommen bevorzugt eine 3.6_{13}-Helix (=α-Helix) oder eine 3_{10}-Helix. Beide unterscheiden sich durch ihre Helixganghöhe sowie der Anordnung ihrer Wasserstoffbrücken (Abb. 5.2.).

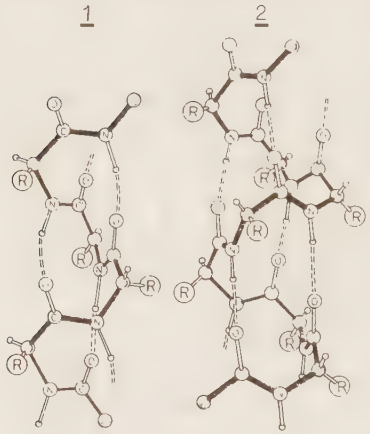


Abb. 5.2. Ausschnitte aus Polypeptidketten mit Anordnung der Wasserstoffbrücken-Bindungen.
3_{10}-Helix = 1;
α- oder 3.6_{13}-Helix = 2.
Abb. aus (142).

Chronologisch gibt sich folgender Verlauf der Diskussion um die Art der Helix in Aib-haltigen Peptiden:
Bereits BLOUT und FASMAN (1962) wiesen darauf hin, daß für Poly-α-Aminoisobuttersäure neben der α-Helix auch eine 3_{10}-Helix in Betracht gezogen werden kann.
BURGESS und LEACH (1977) nahmen unter Berücksichtigung von Röntgen-Strukturdaten, Konformationsberechnungen und physikalisch-chemischen Daten eine α-helikale Struktur für Poly-α-Aminoisobuttersäure an und sprechen der α-Aminoisobuttersäure in Peptiden eine obligatorische α-helixbildende Funktion zu (143).

MALCOLM (1977) kam durch Elektronendiffraktionsmessungen und Infrarotspektroskopie mit polarisiertem Licht an Poly-α-Aminoisobuttersäure zu Schluß, daß eher eine 3_{10}-Helix als eine α-Helix die bevorzugte Konformation ist (144).
Desgleichen fanden SMITH et. al. (1977) für den N-Terminus des Alamethicin Boc-L-Pro-Aib-L-Ala-Aib-OBzl den Beginn einer Windung der 3_{10}-Helix (145).
SHAMALE et. al. wiesen durch Röntgenstrukturanalyse am Modellpeptid Boc-$(Aib)_5$-OMe (1978) drei aufeinanderfolgende ß-Turns (146) und am geschützten, synthetischen N-terminalen Tetrapeptid des Alamethicin Z-Aib-L-Pro-Aib-L-Ala-OMe (1977) zwei aufeinanderfolgende ß-Turns nach, die den Beginn einer 3_{10}-Helix im Alamethicin darstellen können (147). Auch die ^{1}H-NMR-Messungen dieser Autoren (1979) an Z-Aib-Pro-Aib-OMe und Z-Aib-Pro-Aib-Ala-OMe werden als ß-Turn und 3_{10}-Helix interpretiert (148).
Von VENKATACHALAPATHI und BALARAM (1979) durchgeführte ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR und IR-Untersuchungen an Piv-Pro-Pro-Ala-NH-CH_3 deuten auch bei diesem Tripeptid auf das Vorliegen einer 3_{10}-Helix hin (149). Auch die in diesem Arbeitskreis (1979) durchgeführte Röntgenstrukturanalyse des Z-Aib-Pro-NH-CH_3 zeigt einen ß-Turn bereits in diesem kurzen Peptid (150).
Das vorliegende Datenmaterial spricht demnach eher für das Vorliegen einer 3_{10}-Helix als das einer α-Helix in Aib-Peptiden. Allerdings kann von der Struktur der bislang untersuchten Oligopeptide nicht ohne weiteres auf diejenige von Polypeptiden geschlossen werden. Argumente gegen die 3_{10}-Helix sind ihre im Vergleich zur α-Helix energetisch ungünstigere Konformation. Deshalb wurde in Proteinen das Vorliegen einer 3_{10}-Helix bislang nur selten beobachtet. Diese bildet zudem nur kurze Stücke, interessanterweise bevorzugt an den N- und C-terminalen Enden von α-Helices (142).
Eine sichere Klärung dieser Frage ist erst durch Röntgenstrukturanalysen von größeren synthetischen Peptiden sowie von natürlichen Polypeptiden wie Trichotoxin und seinen Analoga zu erwarten (vergl. hierzu auch Abb. 5.10. und insbesondere Abschn. 6.).

5.2. ^{13}C-NMR-Untersuchungen an Trichotoxin A-40, daraus isolierten Partialsequenzen und Modellpeptiden[+]

Die Aussagekraft von mittels ^{13}C-NMR- und ^{1}H-NMR-Spektroskopie durchgeführten Untersuchungen amphiphiler Polypeptidantibiotika hatte sich bereits beim Alamethicin gezeigt, da die Nachweise für das Vorliegen eines N-acetylierten N-Terminus und die Anwesenheit des aromatischen Aminoalkoholes Phenylalaninol durch Anwendung dieser Methoden geführt wurde (12, 13, 132).
Auch das Vorhandensein von Alkyl-Signalen bei 7.6 ppm in ^{13}C-NMR-spektroskopisch untersuchten Proben von Trichotoxin und Suzukacillin deuteten auf die Anwesenheit einer ungewöhnlichen, nicht-proteinogenen Aminosäure hin. Desgleichen wies das ^{13}C-NMR-Signal einer alkoholischen Gruppe bei 64.7 ppm im Trichotoxin auf das Vorliegen eines Aminoalkoholes hin, der infolge Fehlens von Signalen im für Aromaten charakteristischen Bereich, nicht mit Phenylalaninol identisch sein konnte.
Bei früher durchgeführten ^{13}C-NMR-Untersuchungen des Alamethicin (14, 132), Suzukacillin (37), Trichotoxin (37) und synthetischer, Aib-haltiger Modellpeptide (110, 111, 132, 158) hatte sich gezeigt, daß auch Aussagen über die Konformation dieser Peptide in Lösungen durch ^{13}C-NMR-Untersuchungen gemacht werden konnten. Die Aufspaltung bis zu etwa 4 ppm der Aib-C_{β}-Resonanzen in zwei Signalgruppen beim Vorliegen einer helikalen Konformation der Peptide erwies sich als eine mit der CD-Spektroskopie in ihren Aussagen übereinstimmende, jedoch davon unabhängige Methode. Die Isolation hochreinen Trichotoxin A-40, welches völlig frei vom Analogen A-50 war, ermöglichte die Aufnahme von ^{13}C-NMR-Spektren, deren Interpretation durch die Untersuchungen isolierter Partialsequenzen und synthetischer Modellverbindungen abgesichert wurde.

[+]Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier, Universität Bonn, danke ich vielmals für die Aufnahme des überwiegenden Teiles der Spektren.

Die ^{13}C-NMR-Verschiebungen der Aminosäuren in den nachfolgend diskutierten Peptiden erstrecken sich über einen Bereich von 17 - 180 ppm relativ zu Tetramethylsilan (δ_{TMS} = 0 ppm). Die einzige Ausnahme ist das Iva-C_γ-Signal bei 7.6 ppm. Signale bei tiefstem Feld (170-180 ppm) sind die ^{13}C-Resonanzen der Carbonylgruppen. Die für jede Aminosäure charakteristischen C_α-Signale erstrecken sich über einen Bereich von 46 bis 64 ppm. Bei höherem Feld, zwischen 17 und 41 ppm, erscheinen die Signale für C_β-Atome, zwischen 20 und 33 ppm die Resonanzen für andere aliphatische Seitengruppen.
Wesentlich für die konformative Aussagen sind insbesonders die magnetischen Nichtäquivalenzen (MNE) der ß-Methyl-Signale der α-Aminoisobuttersäure (Abb. 5.9.).
In Peptiden mit einer nichtchiralen Umgebung des Aib, oder freier Drehbarkeit der mit den α-C-Atomen verknüpften Bindungen, fallen die Signale der beiden Methylgruppen zusammen.

Dipeptide zeigen eine geringfügige Aufspaltung (ca. 0.5 ppm) der Aib-C_β-Signale die durch chirale Nachbargruppen verursacht wird.

N-acylierte Tripeptide und kurze Oligopeptide zeigen eine stärkere Aufspaltung der Aib-C_β-Signale, deren MNE sich nicht nur durch die Asymmetriezentren benachbarter chiraler Aminosäuren erklären läßt. Hier muß vielmehr eine geordnete Struktur, und damit verbunden eine Einschränkung der Drehbarkeit der mit Aib-C_α verknüpften Bindungen vorliegen.

Die Aufspaltung der C_β-Resonanzen in helikalen Aib-Peptiden bis zu 4 ppm beruht auf der stark unterschiedlichen elektronischen Umgebung der beiden Methylgruppen. Diese wird verursacht durch die infolge Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen geordnete und damit zu einem Helixdipol führende Ausrichtung der Peptidbindungen.

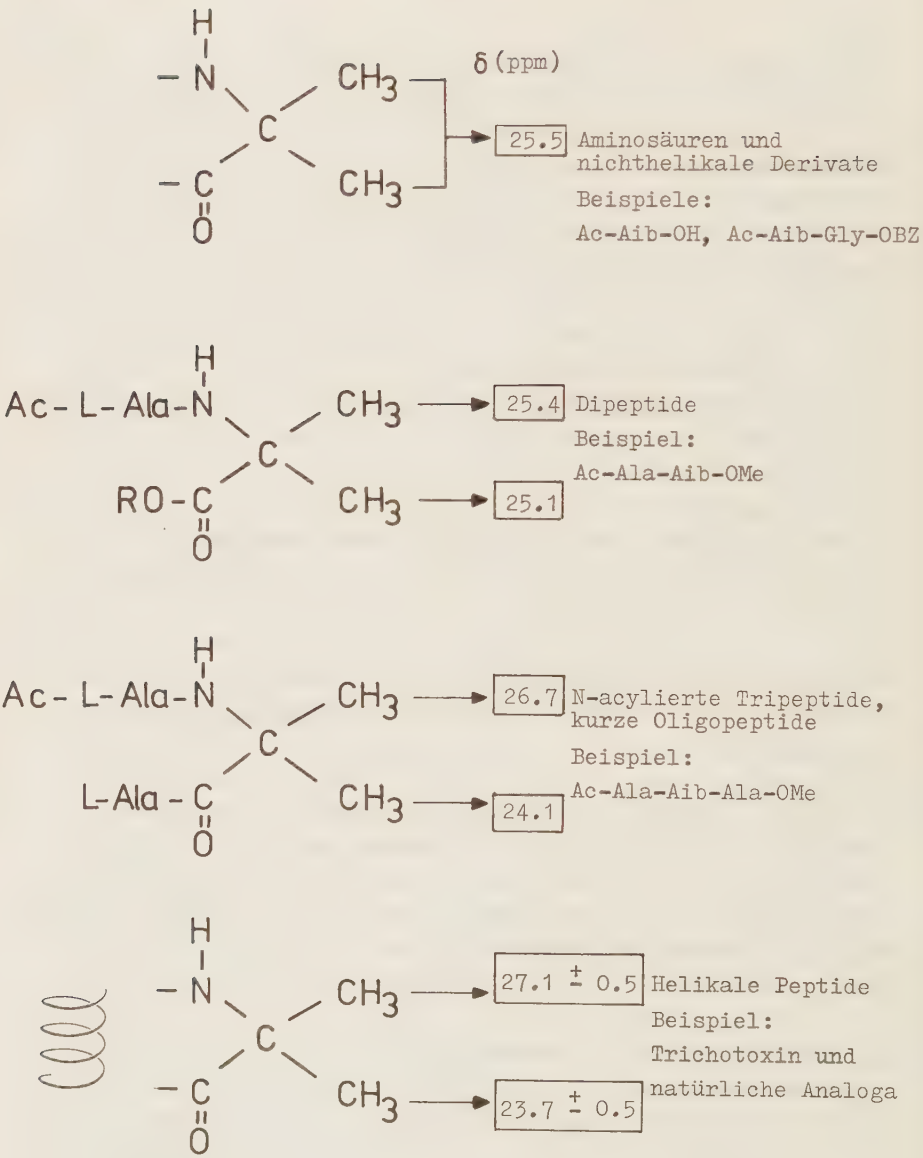


Abb. 5.9. ^{13}C-NMR-Signale der C_{β}-Kohlenstoffatome von α-Aminoisobuttersäure in Peptiden

5.2.1. ^{13}C-NMR-Signale N-acetylierter Peptide und von N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure

Auffallend beim N-acetylierten Tripeptidester Ac-Ala-Aib-Ala-OMe ist die starke Aufspaltung der Aib-Methylgruppen-Signale um 2.6 ppm (Tab. 5.1.). Diese starke MNE lässt sich nicht allein durch chirale Nachbargruppeneffekte der beiden L-Alanine erklären. Es ist vielmehr das Vorliegen einer bestimmten Konformation in Lösung und Einschränkung der Rotationsfreiheitsgrade der mit Aib-C_α verknüpften Bindungen anzunehmen.
In Frage kommt hier insbesondere ein durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke entstandener sogenannter ß-Turn, der auch als Ausschnitt einer 3_{10}-Helix betrachtet werden kann (148, 149, 159). Im Tripeptid sind hierbei zunächst zwei Möglichkeiten der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung in Betracht zu ziehen: zum einen zwischen dem Sauerstoff der Acetylgruppe und der Säureamidgruppe des C-terminalen Alanin; zum anderen zwischen der Säureamidgruppe des N-terminalen Alanin und der Carbonylgruppe des C-terminalen Alanin.
Einen Hinweis gibt der Vergleich der MNE der Aib-Methylgruppen, der in Boc-Ala-Aib-Ala-OMe 1.8 ppm beträgt (137), im Ac-Ala-Aib-Ala-OMe dagegen 2.6 ppm.
Die starke Beeinflußung der MNE der Aib-C_β-Gruppen durch das jeweilige Acylierungsmittel (Acetyl- bzw. tert. Butyloxycarbonyl) spricht jedoch für eine direkte Beteiligung derselben und damit für die erste Möglichkeit, d. h. der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke unter Einbeziehung der Carbonylgruppe des Acylierungsmittels.
Ein weiteres Argument ist die chemische Verschiebung der Ala-C_α-Signale vergleichbarer Di- und Tripeptide. Die Ala-C_α-Resonanz im Ac-Ala-Aib-OMe beträgt 53.0 ppm, die von Ala^1 im Tripeptid Ac-Ala^1-Aib-Ala^2-OMe 51.0 ppm, zeigt also eine Hochfeldverschiebung. Die C_α-Signale des C-terminalen Alanin im Dipeptid Ac-Aib-Ala-OH und des Ala^2 im Tripeptid Ac-Ala^1-Aib-Ala^2-OMe betragen übereinstimmend 49.6 ppm. Die Hochfeldverschiebung des Ala^1-C_α-Signales im Tripeptid wird demnach durch eine unterschiedliche chemische Umgebung, d. h. durch die Einbe-

ziehung dieses Alanin in einen ß-Turn bewirkt[+] (Abb. 5.10.). Der Unterschied in der MNE der Aib-C_{β}-Signale in Ac- bzw. Boc-Ala-Aib-Ala-OMe erklärt sich durch die wesentlich stärkeren Wasserstoffacceptor-Eigenschaften der Carbonyl-Funktion im Acetylrest im Vergleich zu derjenigen in der tert. Butyloxy-carbonyl-Gruppe.

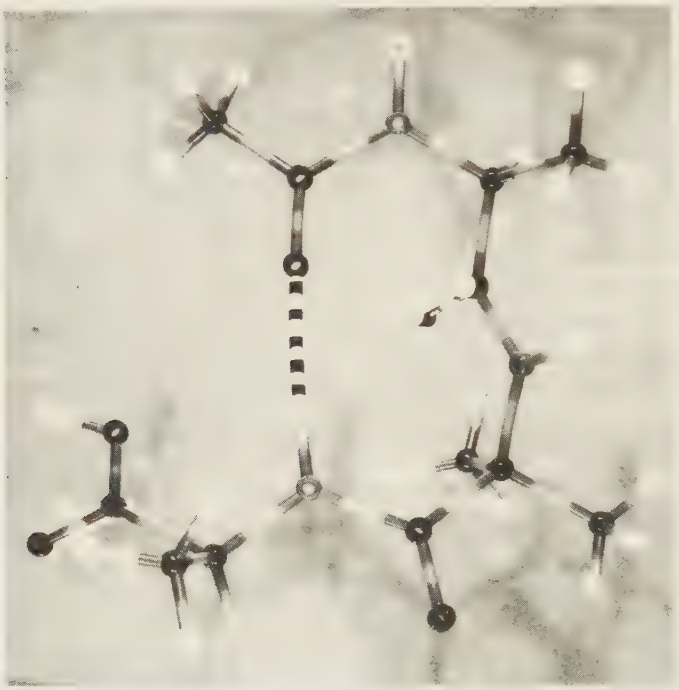


Abb. 5.10. Mögliche Ausbildung eines ß-Turns in Ac-Ala-Aib-Ala-OMe , gestrichelt = Wasserstoffbrückenbindung

---

[+] Ähnliche Verschiebungen sprechen für das Vorliegen eines ß-Turns in Bpoc-$(Ala)_3$-OMe (160 , 161).

Tab. 5.1. ^{13}C-NMR-Signale N-acetylierter Peptide und von N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure (ppm) gegen TMS = 0 ppm

	Lsg.-mittel	CO-Signale	Aib C_α	Aib C_β	Ala C_α	Ala C_β	Gly C_α	Ac-CH_3	CH_2	Bzl C-1	Bzl C-3,5	Bzl C-2,4,6
Ac-Aib-Gly-OBzl	CD_3OD	178.7 Aib 173.0 Ac 171.3 Gly	57.7	25.5 (2x)			42.4	23.0	67.8	138.0	129.6	129.4
Ac-Aib-Ala-OH	CD_3OD	176.8 Aib 176.2 Ala 173.1 Ac	57.8	25.7 25.2	49.6	17.8		23.1				
Ac-Ala-Aib-OMe	CD_3OD	176.1 Aib 174.2 Ala 172.7 Ac	57.0	25.4 25.1	53.0	18.1		22.5	52.6	(OMe)		
Ac-Ala^1-Aib^2-Ala^3-OMe	CD_3OD	177.5 Aib 176.0 Ala^1 174.7 Ala^3 173.4 Ac	57.7	26.7 24.1	51.0 (Ala^1) 49.6 (Ala^3)	17.3 17.2		22.3	52.6	(OMe)		
Ac-Aib-COONa	D_2O/NaOH	182.0 Aib 172.5 Ac	57.5	25.0 (2x)				22.6				
Ac-Aib-COOH	CD_3OD	177.7 Aib 172.2 Ac	56.5	25.2 (2x)				22.6				

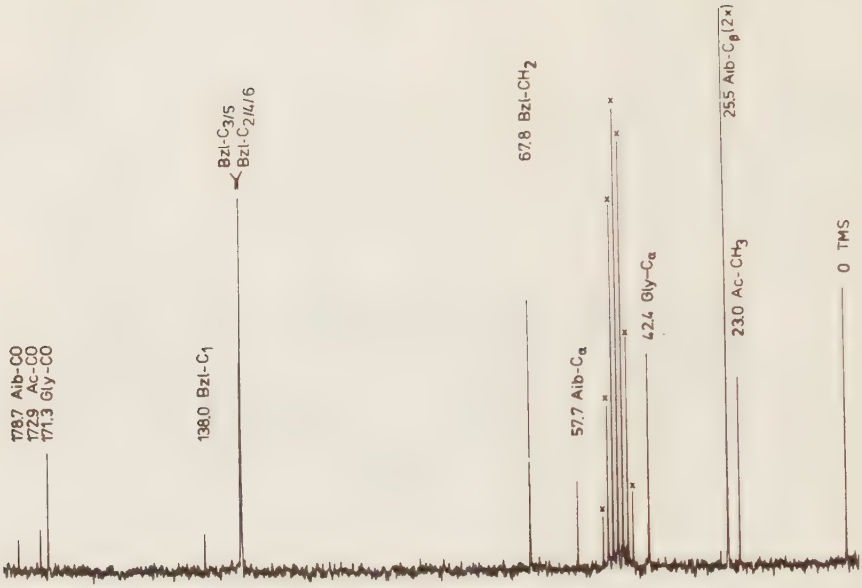


Abb. 5.11. ^{13}C-NMR-Spektrum von Ac-Aib-Gly-OBzl in ^{2}H-Methanol (x)

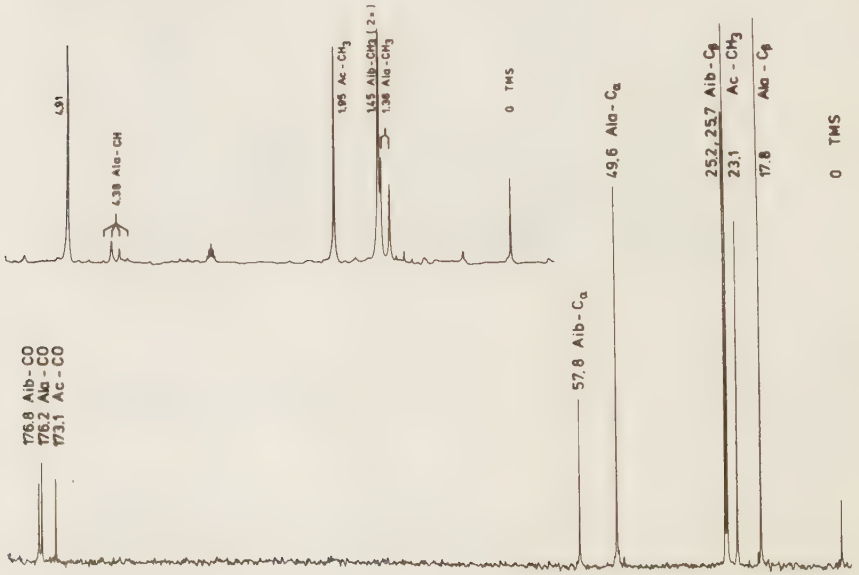


Abb. 5.12. ^{13}C-NMR- und ^{1}H-NMR- (oben links) Spektren von Ac-Aib-Ala-OH in ^{12}C,^{2}H-Methanol

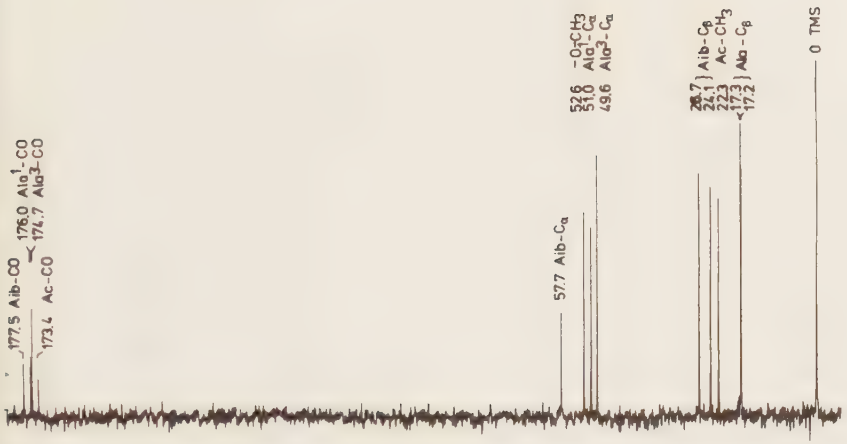


Abb. 5.13. ^{13}C-NMR-Spektrum von Ac-Ala^1-Aib-Ala^3-OMe in ^{12}C, ^2H-Methanol

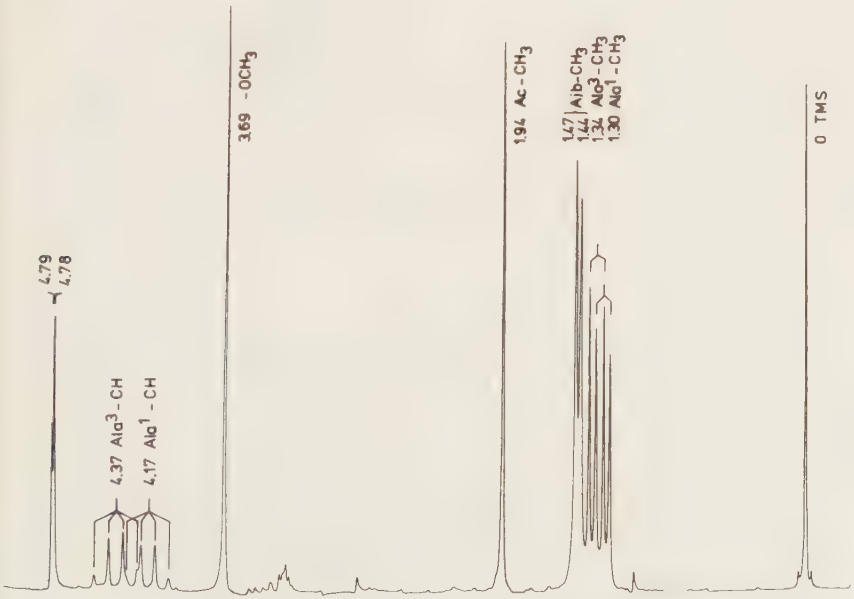


Abb. 5.14. ^1H-NMR-Spektrum von Ac-Ala^1-Aib-Ala^3-OMe in ^{12}C, ^2H-Methanol

Abb. 5.15. ^{13}C-NMR-Spektrum von Ac-Ala-Aib-OMe in ^{2}H-Methanol (x)

5.2.2. ^{13}C-NMR-Signale von Valinol und Derivaten sowie Isovalin

Für acidolytische Spaltversuche (Abschn. 4.2.2.), massenspektrometrische Untersuchungen (Abschn. 3.3.4.) und spektroskopische Vergleichszwecke waren eine Anzahl Verbindungen synthetisiert worden, deren Signalzuordnung die Interpretation der Spektren größerer Peptide erleichterte (Tab. 5.2.).

Der Einfluß des pH-Wertes auf die chemische Verschiebung ist deutlich, teilweise sogar beträchtlich größer als die Meßgenauigkeit von ^{13}C-NMR-Messungen und kann zur Signalzuordnung insbesondere protonierbarer Gruppen und deren chemischer Umgebung verwendet werden (Abb. 5.16. und 5.17.). Das Carbonyl-Signal des Prolin zeigt eine starke Tieffeldverschiebung im alkalischen Bereich durch Vorliegen einer COO^--Gruppe; C_α wird nur im sauren Bereich geringfügig hochfeldverschoben. Interessant am Valinol ist die Aufspaltung der C_γ-Signale im alkalischen Bereich und die entgegengesetzt erfolgende chemische Verschiebung der C_α- und C_β-Signale in D_2O. Diese deutet auf eine gewisse Rotationsbehinderung der aliphatischen Seitengruppe >pH 7, die im sauren Bereich aufgehoben ist. In CD_3OD zeigen die C_γ-Gruppen in Valinol-hydrochlorid und von peptidisch gebundenen Valinol in allen Fällen eine Aufspaltung.
Durch den ^{13}C-NMR-Vergleich von synthetischem Boc-Glu(Vol)-NH_2 bzw. Z-Gln-Vol sollte unter anderem untersucht werden, ob die α- oder γ-Verknüpfung des Aminoalkohols signifikante Unterschiede der ^{13}C-Resonanzen ergibt. Bedingt durch die Schwerlöslichkeit des Z-Gln-Vol in CD_3OD wurden vergleichende Messungen auch in $(D_3C)_2SO$ vorgenommen. Normalerweise verschieben sich beim Übergang $(D_3C)_2SO \rightarrow CD_3OD$ alle freien Peptid-Carbonyl-Signale zu tieferem Feld um mehr als 1 ppm; andererseits zeigen Carbonyle in H-Brücken eine geringere Lösungsmittelabhängigkeit. Die Unterschiede in den ppm-Werten besonders der CO-Gruppen von Boc-Gln-Vol und Z-Gln-Vol (in DMSO) gegenüber Boc-Glu(Vol)-NH_2 sind somit überwiegend auf die unterschiedlichen Lösungsmittel und weniger auf die unterschiedliche Verknüpfung des Valinolrestes zurückzuführen (132).

Die C_γ-Methylgruppe des Isovalin zeigt das charakteristische Signal von 7.4 ppm (D_2O) bzw. 7.6 ppm (CD_3OD).

Tab. 5.2. ^{13}C-NMR-Signale von Valinol und Derivaten sowie Isovalin

	Lsg.-mittel	CO-Signale	Glu bzw. Gln C_α	Glu bzw. Gln C_β	Glu bzw. Gln C_γ	Valinol (=Vol) C_α	Valinol (=Vol) C_β	Valinol (=Vol) $C_{\gamma a,b}$	Valinol (=Vol) CH_2OH	Boc und Z Boc:CH_3	Boc und Z C_q	Boc und Z Z:CH_2	Boc und Z C-1	Boc und Z C-3,5	Boc und Z C-2,4,6
Boc-Glu(Vol)-NH_2	CD_3OD	177.4 Glu-γ 175.0 Glu-α 157.6 Boc	56.0	29.6	33.4	55.4	30.0	18.9 20.1	63.2	28.7	80.7				
Boc-Glu(Vol)-NH_2	$(D_3C)_2SO$	173.9 Glu-γ 171.5 Glu-α 155.1 Boc	55.3	28.1[a]	32.0	53.6	28.1[a]	18.0 19.5	61.2	28.1[a]	80.0				
Z-Gln-Vol	$(D_3C)_2SO$	173.2 Gln-γ 170.6 Gln-α 155.2 Z	54.9	27.4[b]	30.9	53.9	27.4[b]	17.4 19.0	60.7			64.6	136.4	127.5	127.0
HCl x Valinol	CD_3OD					60.3	29.2	18.8 19.2	60.7						
Valinol	D_2O (pH=11.35)					57.1	29.4	17.1 18.8	64.4						
DL - Iva	D_2O	176.9 (CO), 62.0 (C_α), 30.2 ($CH_{2\beta}$), 22.0 ($CH_{3\beta}$), 7.4 (C_γ)													

exp. a bzw. b = fünffache bzw. doppelte Signalintensität

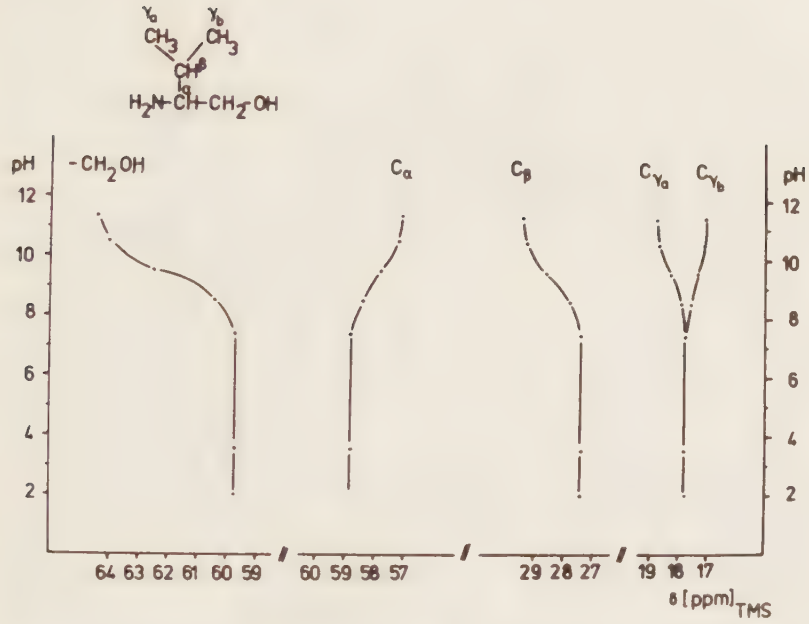


Abb. 5.16. pH-Abhängigkeit der ^{13}C-NMR-Signale von L-Valinol (D_2O)

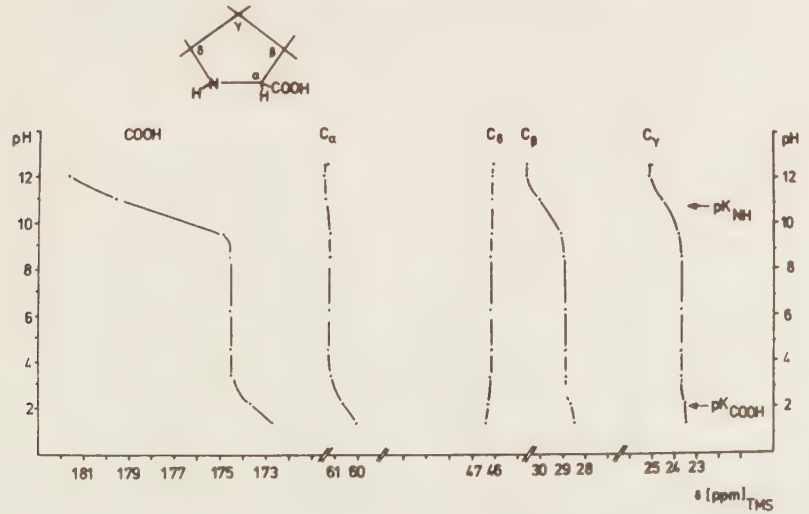


Abb. 5.17. pH-Abhängigkeit der ^{13}C-NMR-Signale von L-Prolin (D_2O)

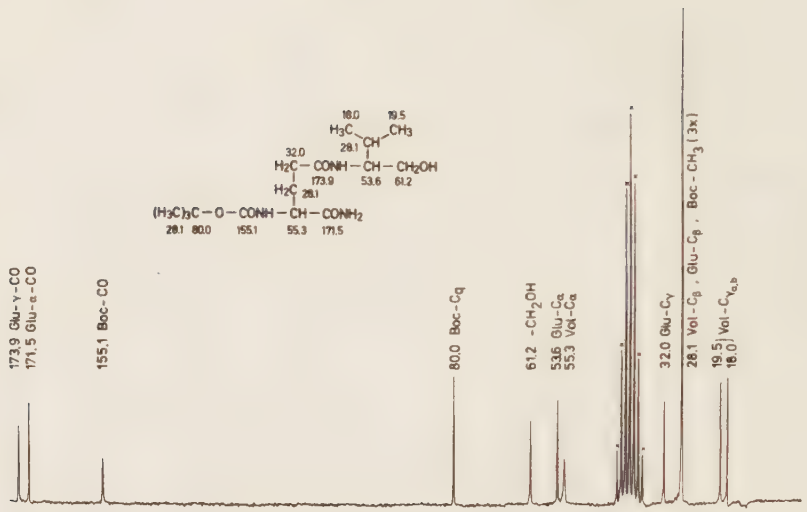


Abb. 5.18. ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Glu(Vol)-NH_2 in ^{2}H-Dimethylsulfoxid (x)

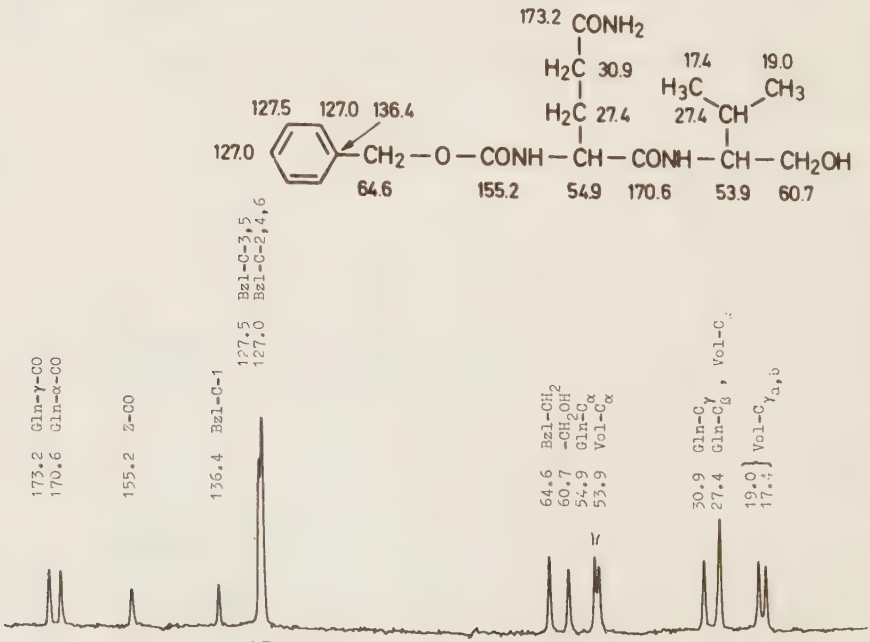


Abb. 5.19. ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Gln-Vol in ^{2}H,^{12}C-Dimethylsulfoxid

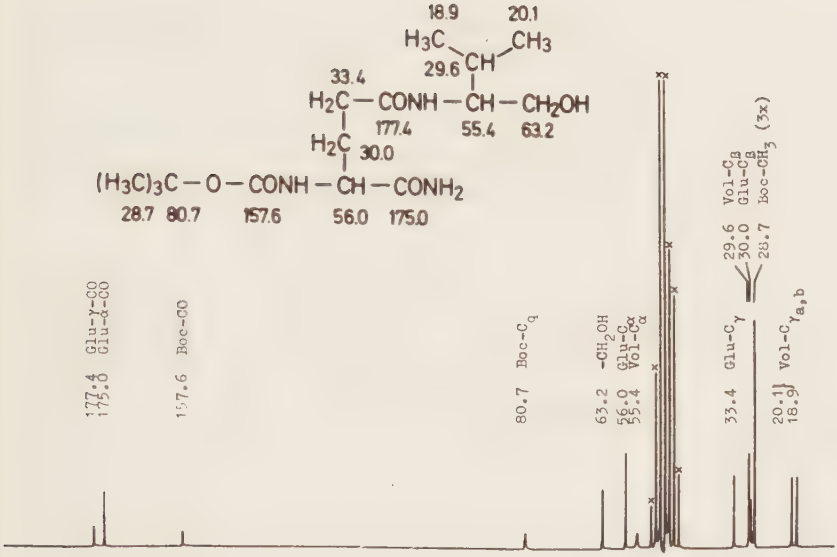


Abb. 5.20. ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Glu(Vol)-NH_2 in ^{2}H-Methanol (x)

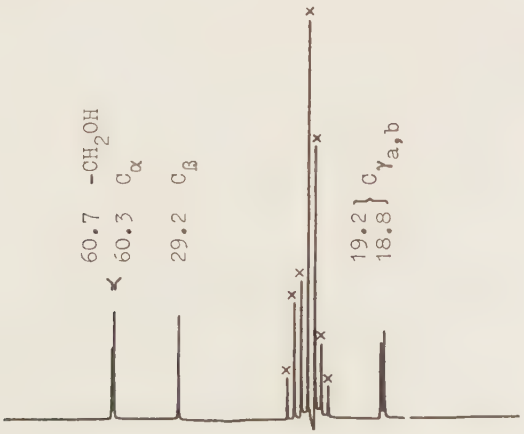


Abb. 5.21. ^{13}C-NMR-Spektrum von Valinol-hydrochlorid in ^{2}H-Methanol (x)

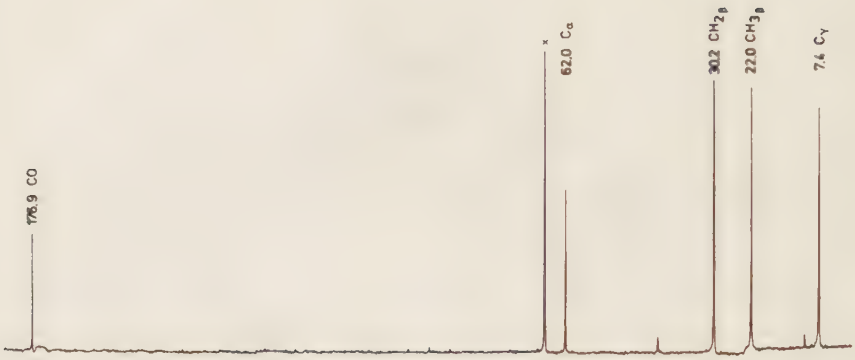


Abb. 5.22. ^{13}C-NMR-Spektrum von DL-Isovalin in D_2O (x = Dioxan)

5.2.3. ^{13}C-NMR-Signale von Trichotoxin A-40 und Partialsequenzen

Die nach selektiver Trifluoracetolyse aus Trichotoxin A-40 durch anschließende Kieselgel-Säulenchromatographie und multiplikative Gegenstromverteilung isolierten Dodekapeptide 1 und 2 sowie das Prolylpeptid 2 (vergl. Abb. 4.7.), erlaubten in Verbindung mit synthetischen Modellsubstanzen den Vergleich und die Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale des Trichotoxin A-40. Nachfolgend seien die wichtigsten Signale und Signalgruppen diskutiert.

Im Spektrum des Prolylpeptides fällt sofort das bei höchstem Feld überhaupt erscheinende Signal des Iva-C_γ bei 7.9 ppm auf. Dieses Signal erscheint im Trichotoxin A-40 bei 7.6 ppm, dagegen auch nicht andeutungsweise in den Spektren der Dodekapeptide. Dies ist wesentlich im Hinblick auf das in Abschn. 3.1.2. und Tab. 4.8. hingewiesene Problem des Isovalin-Untergrundes in der Aminosäureanalyse.

Signale, die in den Spektren des Prolylpeptides und Trichotoxin A-40 erscheinen und in denen der Dodekapeptide erwart-

ungsgemäß fehlen sind (Werte in Klammer gelten für Trichotoxin A-40): Vol-CH_2OH 63.6 ppm (64.7 ppm), Pro-C_α 61.1 ppm (63.7 ppm), Iva-C_α 60.8 ppm (61.0 ppm).
Zu berücksichtigen ist, daß das Spektrum des Prolylpeptides in $^{12}CD_3OD/^{12}CDCl_3$ (9:1, v/v), die der Dodekapeptide und des Trichotoxin A-40 in reinem Methanol aufgenommen sind.

Charakteristisch für die Spektren des Prolylpeptides und Trichotoxin A-40 sind auch die Signale der Vol-C_α-Kohlenstoffatome bei 19.4 ppm und 20.1 ppm (19.6 ppm und 20.1 ppm), die in den Dodekapeptid-Spektren fehlen.
Signale die im Prolylpeptid-Spektrum nicht vorhanden sein dürfen, jedoch in denen der Dodekapeptide, sind diejenigen für Alanin und Glycin.
Gly-C_α gibt im Dodekapeptid 1 bzw. 2 je ein Signal bei 46.0 ppm bzw. 45.9 ppm (46.0 ppm). Diese Signale fallen bei den Dodekapeptide jeweils mit einem Signal des Lösungsmittel-Heptetts (CD_3OD) zusammen, sind jedoch durch die Größe des Flächenintegrals bzw. der Intensität eindeutig zuordenbar. Trichotoxin A-40 selbst wurde in ^{12}C-Methanol vermessen, dieses Problem stellt sich deshalb dort nicht.
Besonders interessant und aufschlußreich ist der Vergleich der Ala-C_α- und C_β-Signale.
Das Dodekapeptid 1 enthält Ala^9 und Ala^{10} in benachbarten Positionen. Das Dodekapeptid 2 unterscheidet sich vom Dodekapeptid 1 durch die Substitution des Ala^9 durch ein Aib. Dies ist in den ^{13}C-NMR-Spektren deutlich zu erkennen: das Dodekapeptid 2 zeigt nur 1 Ala^{10}-C_β-Signal bei 17.1 ppm und 1 Ala^{10}-C_α-Signal bei 52.5 ppm. Das Dodekapeptid 1 hingegen gibt jeweils zwei gut getrennte und gleich intensive Signale: für Ala^9-C_β bei 16.9 ppm und Ala^{10}-C_β bei 17.2 ppm bzw. Ala^9-C_α bei 52.0 ppm und Ala^{10}-C_α bei 53.0 ppm. Die C_α-Signale fallen in den Bereich des Lösungsmittel-Heptetts, sind jedoch deutlich separiert.

Die Zuordnung der Signale des mehr im helikalen Bereich liegenden Ala^9 erfolgt durch Vergleich der Dodekapeptid-Spektren untereinander:

Ala^{10}-C_β im Dodekapeptid 2 zeigt ein Signal bei 17.1 ppm. Deshalb wird Ala^{10}-C_β im Dodekapeptid 1 das Signal bei 17.2 ppm zugeordnet und dem im mehr helikalen Teil befindlichen Ala^{9}-C_β der Wert bei 16.9 ppm.
Diese Zuordnung stimmt mit Messungen an einem synthetischen, Aib-haltigen Nonadekapeptid überein, bei dem die Ala-C_β-Signale in helikaler Umgebung Resonanzen bei 17.1 ppm und in nichthelikaler Umgebung bei 17.7 ppm zugeordnet werden (110, 111). Ein Vergleich mit dem natürlichen Analoga des Trichotoxin A-40, dem Alamethicin, kommt zu übereinstimmenden Ergebnissen. Zusammenfallende Signale erhält man für die sich vollständig im helikalen Teil des Moleküls befindlichen $Ala^{4,6}$-C_β bei 16.9 ppm und für $Ala^{4,6}$-C_α bei 53.4 ppm (132).
Diese Interpretation steht auch in Übereinstimmung mit den durch durch Untersuchungen des Circulardichroismus erhaltenen Ergebnissen (vergl. Abschn. 5.1.). Hier hatte sich gezeigt, daß die Dodekapeptide noch eine eindeutige, wenn auch im Vergleich zum Trichotoxin A-40 selbst etwas verminderte, helikale Struktur besitzen. Die relativ leichte acidolytische Abspaltbarkeit des C-terminalen Tripeptides H-Ala-Aib-Aib-OH vom C-Terminus des Dodekapeptides 2 deutet darauf hin, daß hier eine weniger fixierte Konformation, vielleicht eine etwas "aufgeweichte" Helix vorliegt. In diesem Sinne ist auch die Verwendung des Begriffes helikaler und nichthelikaler Teil zu verstehen.

Die Resonanz bei 53.0 ppm im Dodekapeptid 1 wird Ala^{9}-C_α im helikalen Bereich zugeordnet, das Signal bei 52.0 ppm Ala^{10}-C_α. Auch dies stimmt überein mit dem synthetischen Nonadekapeptid wo nichthelikale Ala-C_α-Signale im Vergleich zu helikalen bei höherem Feld erscheinen.
Erwartungsgemäß sind im Spektrum des Trichotoxin A-40 die Alanin-Signale in den entsprechenden Bereichen zu finden wie im Dodekapeptid 1. Auffallend ist jedoch ein im Trichotoxin A-40 sich deutlich vom Rauschen abhebendes Signal bei 17.7 ppm. Dies wird dem durch Austausch des Glycin in Position 2 duch ca. 10 % Alanin charakterisierten Sequenzanalogen zugeordnet (vergl. Abb. 4.7.) und ist in guter Übereinstimmung mit dem Ala-C_β-Sig-

nal bei 17.8 ppm des Modellpeptides Ac-Aib-Ala-OH (Tab. 5.1.).

Die Aufspaltung der Aib-C_{β}-Signale in helikaler Umgebung wurde bereits in Abschnitt 5.2. angesprochen. Differenziert man die beiden Methylgruppen des Aib noch durch die Bezeichnung a und b, so ergeben sich jeweils zwei, im Vergleich zum Leu-C_{γ}-Signal nach tieferen bzw. höheren Feld verschobene Signalgruppen:

Trichotoxin A-40 :	10 Aib-$C_{\beta a}$	26.9 - 27.6 ppm
	2 Leu-C_{γ}	26.0 ppm
	10 Aib-$C_{\beta b}$	23.3 - 24.2 ppm
Dodekapeptid 1 :	7 Aib-$C_{\beta a}$	26.9 - 27.3 ppm
	1 Leu-C_{γ}	26.1 ppm
	7 Aib-$C_{\beta b}$	23.4 - 25.5 ppm
Dodekapeptid 2 :	8 Aib-$C_{\beta a}$	26.5 - 27.5 ppm
	1 Leu-C_{α}	26.0 ppm
	8 Aib-$C_{\beta b}$	23.4 - 24.9 ppm

In den Spektren der Dodekapeptide 1 und 2 sind deutlich mit (W) bezeichnete Signale zu erkennen, die nicht im Trichotoxin A-40 enthalten sind und die bei der Trennung der beiden Peptide durch multiplikative Gegenstromverteilung in die Proben gelangten. Verursacht sind sie durch den Weichmacher Diisooctylphthalat, der eindeutig identifiziert werden konnte (vergl. Abb. 5.27.). Eine Beeinflußung bei der Interpretation der Spektren ergibt sich nur bei den mit Aib-C_{β} zusammenfallenden Signalen bei 23.9 $\pm$ 0.1 ppm und 24.5 $\pm$ 0.1 ppm; alle anderen Weichmacher-Signale sind deutlich separiert.

Die Zahl der Carbonyl-Signale stimmt mit den zu erwartenden (in Klammer angegeben) bei Partialsequenzen und Trichotoxin A-40 überein:

Das Prolinpeptid (6) gibt 5 Signale, davon eines mit doppelter Intensität. Das Dodekapeptid 1 (14) zeigt 12 Signale, davon eines mit doppelter Intensität, das Dodekapeptid 2 (14) zeigt 10 Signale, davon zwei mit doppelter und eines mit dreifacher Intensität. Trichotoxin A-40 (21-22 bedingt durch die Mikroheterogenität) zeigt 17 Signale, davon zwei in doppelter und eines in ca. dreifacher Intensität.
Die weitere Zuordnung der Carbonyl-Signale erfolgt durch Modellsubstanzen (110, 111, 133, 158). Bei tiefstem Feld erscheinen jeweils die helikalen Aib-CO-Signale (139). Bei höchstem Feld erscheinen die Signale für Gly-CO (172.5 bzw. 172.6 ppm) und Ac-CO (173.3 ppm). Im Modellpeptid Ac-Aib-Ala-OH beträgt der Wert für Ac-CO 173.1 ppm (Tab. 5.1.).

Tab. 5.3. ^{13}C-NMR-Signale des aus Trichotoxin A-40 isolierten C-terminalen Hexapeptids Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol in $^{12}C, ^{2}H$-Methanol

(ppm) gegen TMS = 0 ppm

Aminosäure	CO	C_α	C_β	C_γ	C_δ	CH_2-OH
Pro-	170.0	61.1	28.0	24.6	47.4	
-Leu	174.9	53.8	41.5	24.9	21.8 (a) 24.6 (b)	
-Aib-	177.8	58.5	25.8 (a) 25.9 (b)			
-Iva-	174.9	60.8	23.5 (CH_3) 29.9 (CH_2)	7.9		
-Gln-	176.5 (γ) 174.4 (α)	58.1	29.9	30.9		
-Vol		55.7	28.4	19.4 (a) 20.1 (b)		63.6

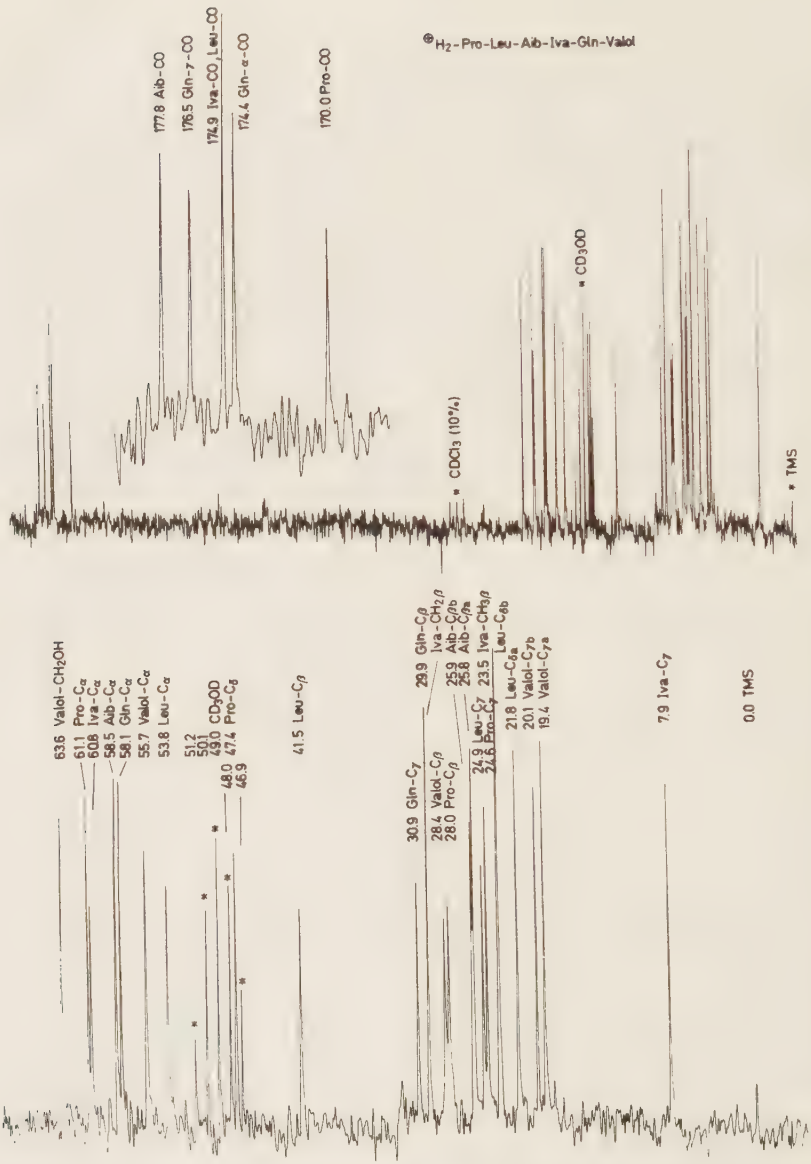


Abb. 5.23. ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol, isoliert aus einem Partialhydrolysat des Trichotoxin A-40
Bedingungen: c = 6 mg/0.5 ml $^{12}CD_3OD/^{12}CDCl_3$ (9:1, v/v), 25 °C, 60 000 scans, 20.115 MHZ

Tab. 5.4. ^{13}C-NMR-Signale der aus Trichotoxin A-40 isolierten N-terminalen Dodekapeptide 1 und 2 in ^{2}H-Methanol^{+}

Dodekapeptid 1 = Ac-Aib^{1}-Gly^{2}-Aib^{3}-Leu^{4}-Aib^{5}-Glu^{6}-Aib^{7}-Aib^{8}-Ala^{9}-Ala^{10}-Aib^{11}-Aib^{12}-OH

δ(ppm)	Kohlenstoffatome	
16.9	1 Ala^{9} -C_{β} (helikal)	
17.2	1 Ala^{10}-C_{β}	
22.0	1 Leu -$C_{\delta a}$	
22.9	1 Ac-CH_3	
23.2	1 Leu -$C_{\delta b}$	
23.4	3 Aib -$C_{\beta a}$	14 Aib -C_{β}
23.7	1 -"-	
24.0	1 -"-	
24.3	1 -"-	
25.0	2 -"-	
25.2	1 -"-	
25.5	1 -"-	
26.1	1 Leu -C_{γ}	
26.9	2 Aib -$C_{\beta b}$	
27.2	1 -"-	
27.3	1 -"-	
27.8	1 Glu -C_{β}, 1 Aib -C_{β}	
32.9	1 Glu -C_{γ}	
40.7	1 Leu -C_{β}	
46.0	1 Gly -C_{α}	
52.0	1 Ala^{10}-C_{α}	
53.0	1 Ala^{9} -C_{α}	
56.6	1 Glu -C_{α}	
57.4	1 Leu -C_{α}	
57.6	5 Aib -C_{α}	7 Aib -C_{α}
57.7		
58.1	1 Aib -C_{α}, 1 Aib^{12}-C_{α}	

$^{+}$(ppm) gegen TMS = 0 ppm

Tab. 5.4. (Fortsetzung)

CO - Signale

δ(ppm)	Kohlenstoffatome
172.8	1 Gly
173.5	1 Ac
175.4	1 Glu-γ-COOH
175.7	1 Leu
176.0	1 Aib^{12}-COOH, 1 Ala^{9}
176.4	1 Ala^{10}
177.4	1 Glu-α-CO
178.0	1 Aib
178.4	1 Aib
178.7	1 Aib 4 Aib, vermutlich helikal
178.9	2 Aib
179.1	1 Aib

Dodekapeptid 2 = Ac-Aib(1)-Gly(2)-Aib(3)-Leu(4)-Aib(5)-Glu(6)-Aib(7)-Aib(8)-Aib(9)-Ala(10)-Aib(11)-Aib(12)-OH

δ(ppm)	Kohlenstoffatome	
17.1	1 Ala^{10}-C_{β}	
21.9	1 Leu -$C_{\delta a}$	
22.9	1 Ac-CH_3	
23.2	1 Leu -$C_{\delta b}$	
23.4	3 Aib -$C_{\beta a}$	16 Aib -C_{β}
23.7	1 -"-	
23.9	2 -"- (+w)	
24.2	1 -"-	
24.9	2 -"- (+w)	
26.0	1 Leu -C_{γ}	
26.5	1 Aib -$C_{\beta b}$	
26.7	1 -"-	
26.8	1 -"-	
27.1	1 -"-	
27.3	1 -"-	
27.4	1 -"-	

Tab. 5.4. (Fortsetzung)

δ (ppm)	Kohlenstoffatome	
27.5	1 Aib $-C_{\beta b}$	
27.7	1 Glu $-C_{\beta}$	
32.8	1 Glu $-C_{\gamma}$	
40.5	1 Leu $-C_{\beta}$	
45.9	1 Gly $-C_{\alpha}$	
52.5	1 Ala^{10} $-C_{\alpha}$	
56.3	1 Glu $-C_{\alpha}$	
57.3	1 Leu $-C_{\alpha}$	
57.5		
57.6	7 Aib $-C_{\alpha}$	8 Aib $-C_{\alpha}$
57.7		
58.0	1 Aib^{12} $-C_{\alpha}$	

CO - Signale

172.5	1 Gly	
173.3	1 Ac	
174.9	1 Glu-γ-COOH	
175.7	1 Leu-CO, 1 Aib^{12}-COOH	
176.4	1 Ala	
177.1	1 Aib	
177.4	2 Aib, 1 Glu-α-CO	
178.1	2 Aib	
178.6	1 Aib^{1}	4 Aib, vermutlich helikal
178.8	1 Aib	

Tab. 5.5. ^{13}C-NMR-Signale von Trichotoxin A-40 in $^{12}C,^{2}H$-Methanol; (ppm) gegen TMS = 0 ppm

δ(ppm)	Kohlenstoffatome
7.6	1 Iva $-C_{\gamma}$
17.1	1 Ala^{9} $-C_{\beta}$ (helikal)
17.3	1 Ala^{10} $-C_{\beta}$
17.7	1 Ala^{2} $-C_{\beta}$ (Gly-Ala-Austausch)
19.6	1 Vol $-C_{\gamma a}$
20.1	1 Vol $-C_{\gamma b}$
21.6	1 Leu^{14} $-C_{\delta a}$
22.0	1 Leu^{4} $-C_{\delta a}$
22.8	1 Ac-CH_3
23.3 }	1 Leu $-C_{\delta b}$
23.4 }	8 Aib $-C_{\beta}$
23.6	1 Iva $-C_{\beta}$, 1 Aib $-C_{\beta}$
24.0 }	2 Aib $-C_{\beta}$
24.2 }	
24.4	1 Pro $-C_{\gamma}$
26.0	2 Leu $-C_{\gamma}$
26.9	7 Aib $-C_{\beta}$
27.7	1 Glu^{6} $-C_{\beta}$
28.4	
30.4 }	1 Pro $-C_{\beta}$
30.6 }	
32.0	1 Gln $-C_{\gamma}$
32.8	1 Glu^{6} $-C_{\gamma}$
40.3	1 Leu^{14} $-C_{\beta}$
40.6	1 Leu^{4} $-C_{\beta}$
46.0	1 Gly $-C_{\alpha}$
50.2	1 Pro $-C_{\delta}$
51.1	1 Ala^{10} $-C_{\alpha}$
53.7	1 Ala^{9} $-C_{\alpha}$
55.2	1 Vol $-C_{\alpha}$

Tab. 5.5. (Fortsetzung)

δ (ppm)	Kohlenstoffatome
56.6	1 Glu $-C_\alpha$
57.3	1 Leu $-C_\alpha$
57.5 } 57.6	7 Aib $-C_\alpha$
58.1	1 Gln $-C_\alpha$, 1 Aib $-C_\alpha$
58.7	1 Aib^{15} $-C_\alpha$
61.0	1 Iva $-C_\alpha$
63.7	1 Pro $-C_\alpha$
64.7	1 Vol-CH_2OH

CO - Signale

172.6	1 Gly
173.3	1 Ac
174.9	1 Iva
175.2	1 Leu^{14}, 1 Gln-α-CO
175.8	1 Leu^{4}
176.0	1 Ala^{9}
176.2 } 176.3 } 176.4	1 Ala^{10}, 1 Pro 1 Glu-γ-COOH
177.1	1 Glu^{6}-α-CO
177.5	1 Aib^{15}, 1 Aib^{16}, 1 Glu-γ-COOH
178.2 } 178.3 } 178.6 } 178.9	7 Aib } 8 Aib (helikal)
179.1	1 Aib^{8} }

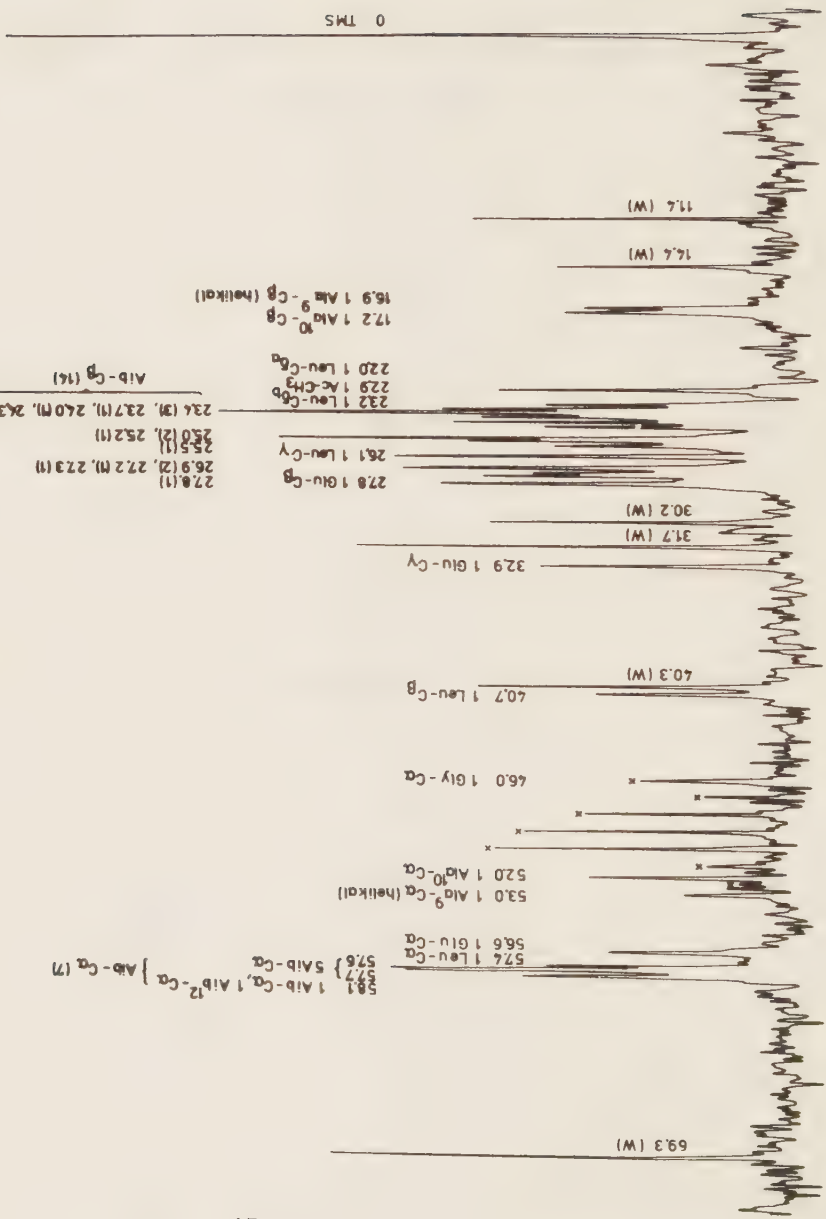


Abb. 5.24. ^{13}C-NMR-Spektrum des Dodekapeptid 1, isoliert aus Trichotoxin A-40
Bedingungen: 10.9 mg/ml CD_3OD (x) ; (W) = Weichmacher

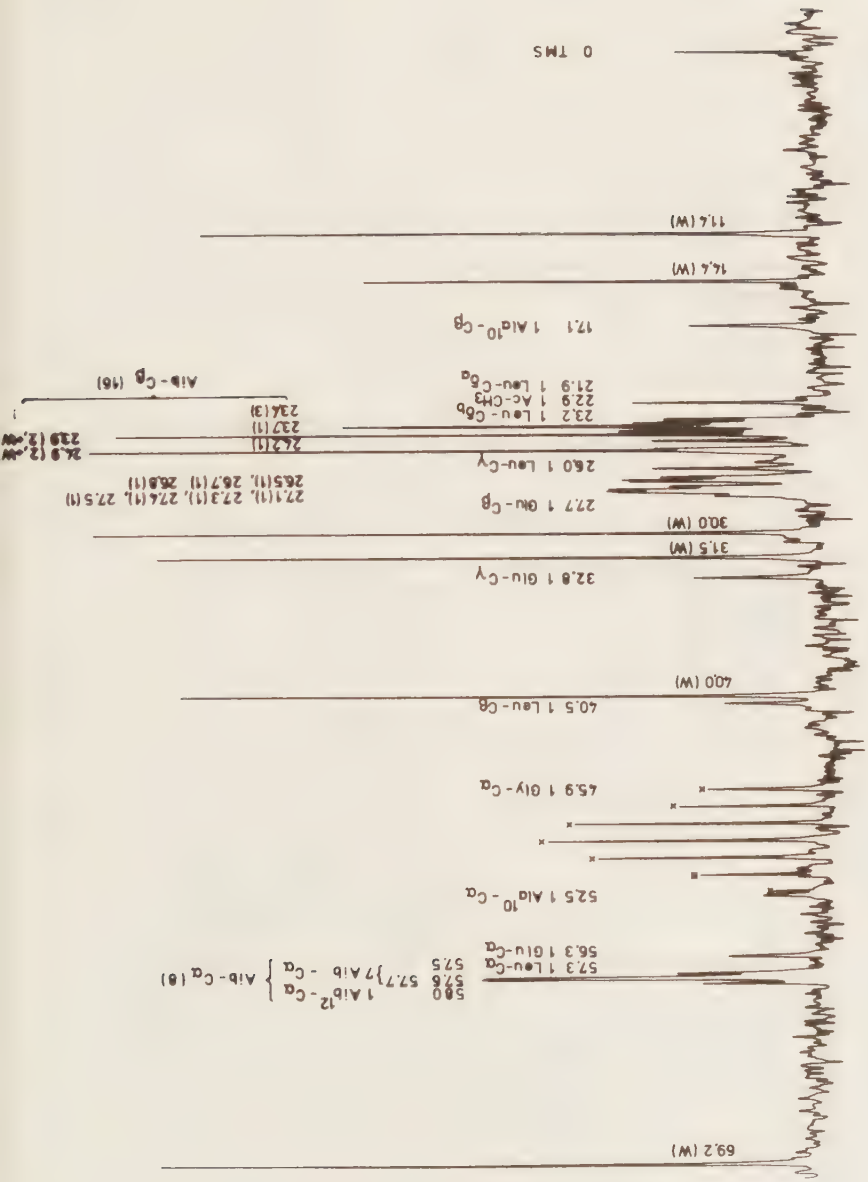


Abb. 5.25. ^{13}C-NMR-Spektrum des Dodekapeptid 2, isoliert aus Trichotoxin A-40
Bedingungen: 11.0 mg/ml CD_3OD (x), 137 000 scans

5.24-1

5.25-1

Abb. 5.24-1 Carbonylteil (gespreizt) des Dodekapeptid 1

Abb. 5.25-1 Carbonylteil (gespreizt) des Dodekapeptid 2

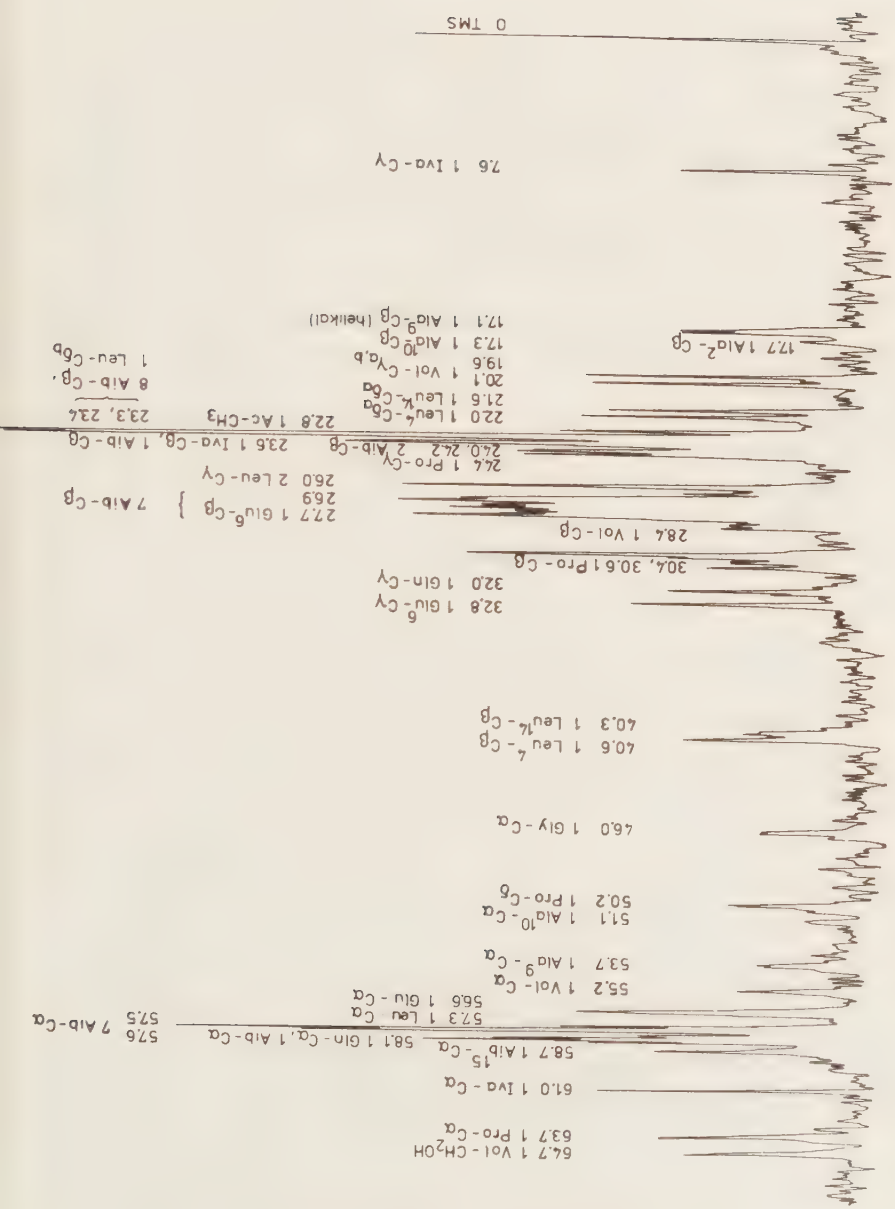
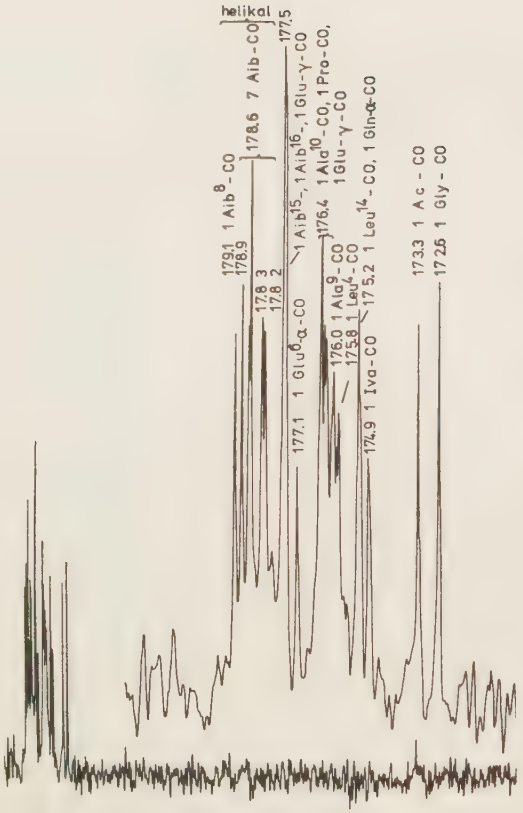
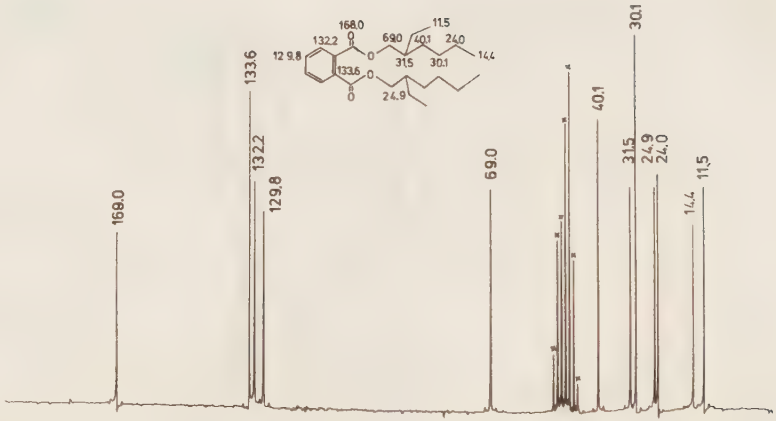


Abb. 5.26. ^{13}C-NMR-Spektrum des Trichotoxin A-40 in $^{12}C,^{2}H$-Methanol
Bedingungen: 50 mg/ml $^{12}CD_3OD$, 10 000 scans



5.26-1



5.27.

Abb. 5.26-1 Carbonylteil (gespreizt) des Trichotoxin A-40

Abb. 5.27. ^{13}C-NMR-Spektrum des Weichmachers Diisooctylphthalat in ^{2}H-Methanol (x)

5.3. Membranmodifizierende Wirkungen

5.3.1. Hämolytische Eigenschaften von Trichotoxin A-40, Derivaten und Partialsequenzen

Die von den verschiedenen Stämmen des Fadenpilzes Trichoderma viride erzeugten, sequenzähnlichen Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin vermögen neben der Erzeugung ionenleitender spannungsabhängiger Poren in künstlichen Lipid-Doppelschicht-Membranen (vergl. 5.3.2.) auch in millimolaren Mengen die Membranen von Erythrozyten und Lymphozyten irreversibel zu lysieren (14-17, 37, 39, 53). Das einzige bekannte, natürliche Polypeptid von vergleichbarer Molmasse, jedoch völlig anderer Aminosäurezusammensetzung, von dem Struktur- und Aktivitätsuntersuchungen zur Lyse gemacht wurden, ist das im Bienengift enthaltene Melittin (95).
Vor kurzem wurde in unserem Arbeitskreis ein synthetisches Nonadekapeptid untersucht, das die konformationsbestimmenden Elemente des Alamethicin enthält und membranmodifizierende Eigenschaften zeigt (111). Die Aktivität dieser Aib-haltigen Peptidantibiotika liegt etwa eine Zehnerpotenz über der des als Standard verwendeten ebenfalls lysierenden Natriumdodecylsulfat (SDS) und etwa eine Zehnerpotenz unter der des Melittin.
Die in größerem Maßstab durchgeführte Trennung des Trichotoxin in die Komponenten A-40 und A-50 erlaubte eine Reihe von Derivatisierungen und Spaltungen. So konnte die Carboxy-Gruppe des ersteren durch Diazomethan verestert, durch Aminolyse ins Amid und durch Hydrazinolyse ins Hydrazid übergeführt werden. Eine selektive Spaltung ergaben N-acylierte Dodekapeptide und C-terminale Prolylhexapeptide (vergl. Abb. 4.7. und 4.8.). Derivate und Fragmente wurden auf ihre Fähigkeit Hämolyse zu bewirken untersucht. Ein Maß für die hämolytische Aktivität ist hierbei die Peptidkonzentration c_{50} in mol/l, bei der 50 % Hämolyse erzielt werden (Abb. 5.3.).
Gemessen wird die Extinktion (λ = 546 nm) des aus Humanerythrozyten freigesetzten und ins Hämiglobincyanid überge-

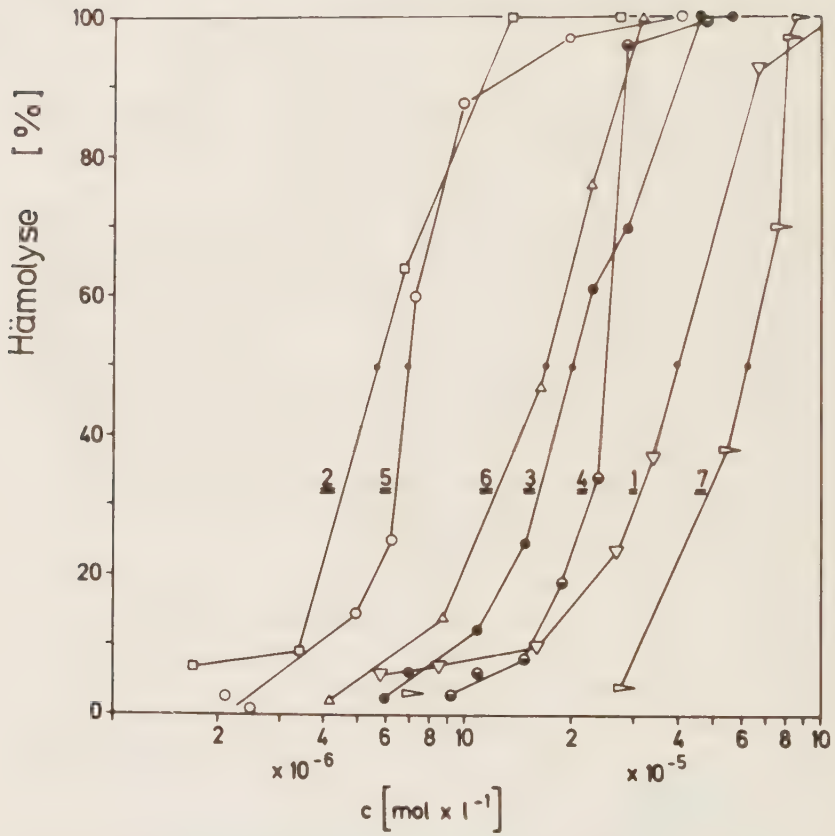


Abb. 5.3. Konzentrationsabhängigkeit der Hämolyse von Human-Erythrozyten durch membranmodifizierende Peptide: Trichotoxin A-40 = 1, dessen Methylester = 2, und Hydrazid = 3, Trichotoxin A-50 = 4, Alamethicin F-50 = 5, synthetisches Nonadekapeptid = 6 (Werte aus Lit. 110) und Natriumdodecylsulfat (Standard) = 7.
Bedingungen: Phosphatpuffer pH 7, 100 % Hämolyse = E_{546} = 0.5, Inkubationszeit 60 min, Temperatur 37 °C

führten Hämoglobins. 50 % Hämolyse ist erreicht, wenn die Extinktion auf die Hälfte zurückgeht, bezogen auf die Extinktion 0.5 bei vollständiger Hämolyse. Aus dem sigmoiden Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven (% Hämolyse = f (lg c)) läßt sich c_{50} entnehmen.
Zur Veranschaulichung des folgenden Sachverhaltes seien zunächst die Sequenzen des Alamethicin, eines synthetischen Nonadekapeptides und Trichotoxin A-40 unter Hervorhebung strukturbestimmender Merkmale gegenübergestellt:

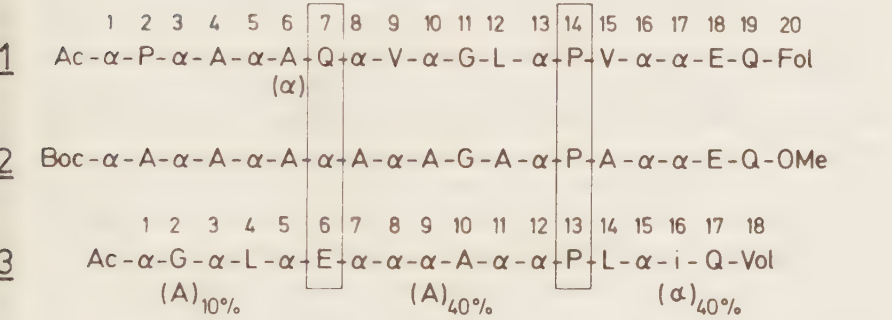


Abb. 5.4. Sequenzen von Alamethicin = 1 (10-13, 18), eines membranmodifizierenden synthetischen Nonadekapeptides = 2 (111), Trichotoxin A-40 = 3 (37, 40)
Abkürzungen nach Biochemistry (1968) 7, 2703; weitere Abkürzungen sind: Ac = Acetyl, Boc = tert. Butyloxycarbonyl, α = α-Aminoisobuttersäure, i = Isovalin, Fol = Phenylalaninol, Vol = Valinol

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven der Hämolyse (Abb. 5.3.) lassen sich folgende Aussagen zur lytischen Aktivität der untersuchten Peptide machen:

Trichotoxin A-40 ($-COO^-$) < Trichotoxin A-50 ($-CONH_2$) < Trichotoxin A-40-hydrazid ($-CONHNH_3^+$) < Trichotoxin A-40-amid[+] ($-CONH_2$) < synthetisches Nonadekapeptid < Alamethicin F-50 ($-CONH_2$) < Trichotoxin A-40-methylester ($-COOMe$)

Diese relative Reihenfolge wird auch bei dem in Position Glu^{18} modifizierten Alamethicin gefunden:

Alamethicin F-30 ($-COO^-$) < Alamethicin F-50 ($-CONH_2$) < Alamethicin-methylester ($-COOCH_3$)

Der Glu^{18}-Benzylester des synthetischen Nonadekapeptides ist ebenfalls aktiver als das Peptid mit freier Glu^{18}-γ-Carboxylgruppe (111).
Keine lytische Aktivitäten zeigen das durch selektive Spaltung aus Trichotoxin A-40 erhaltene N-acylierte Dodekapeptid Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-(Ala)-Ala-Aib-Aib-OH und die C-terminalen Prolylhexapeptide H-Pro-Leu-Aib-Iva(Aib)-Gln-Valinol (vergl. Abschn. 4.3.). Desgleichen nicht das synthetische Dekapeptid Boc-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-OH (OMe) und das Hexadekapeptid Boc-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu-Gln-OH (OMe) (111). Alle diese nichthämolytisch wirkenden Peptide zeigen auch keine Aktivität in Bilayer-Experimenten (vergl. Abschn. 5.3.2.). Zur Erzielung einer hämolytischen Aktivität scheint demnach eine minimale Länge von etwa 18 Aminosäuren erforderlich zu sein. Sofern genügend lipophile Aminosäuren (Aib) vorhanden sind, spielt die Reihenfolge derselben keine ausschlaggebende Rolle.

[+]Nicht in Abb. 5.3. enthalten

Verminderung der negativen Ladung (Veresterung, Amid- bzw. Hydrazidbildung) bewirkt eine Steigerung der lytischen Aktivität. Die Position der Carboxygruppe entweder im helikalen Teil, wie etwa beim Trichotoxin A-40, oder im C-terminalen Teil, wie beim Alamethicin F-30, hat keinen wesentlichen Einfluß.
Zum Lysemechanismus ist anzunehmen, daß der irreversiblen Zerstörung der Zellmembran eine Peptidaggregatbildung vorausgeht, welche durch an der Membranoberfläche adsorbierte Oligomere induziert wird. Die monomeren Peptidantibiotika besitzen in der Lipidgrenzschicht eine hohe laterale Beweglichkeit, wobei der N-terminale Abschnitt der Peptide in engem lipophilen Kontakt mit den Fettsäureresten steht und der polare C-terminale Teil mit den Membranphasen in Wechselwirkung treten können. Treten mehrere Monomere zusammen, so kann es bei Bilayer Experimenten (Abschn. 5.3.2.) zur lokalen, reversiblen Porenbildung kommen. Steigt die Peptidkonzentration bei Lyseexperimenten $>10^{-6}$ mol/l, so wird eine Matrixzerstörung beobachtet, weil größere Bereiche der Lipidschicht mobilisiert sind (17).

5.3.2. Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichtmembranen[+]

Mit die wichtigste Eigenschaft der Zellmembran ist ihre Permeabilität für Ionen. Zum Beispiel beruht das längs einer Nervenfaser fortgeleitete elektrische Signal, das sogenannte Aktionspotential, auf einer vorübergehenden Erhöhung der Permeabilität der Nervenmembran für Natrium- und Kaliumionen. Es ist daher von großer Bedeutung, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die dem Ionentransport durch biologische Membranen zugrunde liegen.
Schematisch seien nachstehend die Eigenschaften der wichtigsten Ionophor-Typen, die für Transportphänomene in Biomembranen verantwortlich sind, wiedergegeben:

Ionophor-Typ	Beispiel, Eigenschaften
Carrier	Valinomycin (47) Bildung selektiver Komplexe, Ionophor ohne Spannungsabhängigkeit
Kanalbildner	Gramicidin A (48) selektive Leitwerte duch helikalen Kanal mit konstantem Durchmesser, Kopf-an-Kopf-Verknüpfung der Monomeren zu Dimeren, keine Spannungsabhängigkeit
Porenbildner	Alamethicin (44) Bildung tonnenartiger Poren aus 3-10 Monomeren, einziger Ionophor: a) mit mehreren Leitwertzuständen b) Spannungsabhängigkeit desselben ähnlich den Na^+/K^+-Kanälen in Biomembranen c) Aktionspotentialen, Oszillationen d) Aggregationen über Seitenketten

---

[+]vergl. nächste Seite

Modellsysteme, die in ihrer Zusammensetzung und Struktur biologischen Membranen weitgehend ähneln, stellen planare Lipiddoppelschichtmembranen dar. Der Hauptunterschied liegt in dem Fehlen von Proteinen, durch die biologische Membranen ihre spezifischen Eigenschaften erhalten. Da die Isolierung von Membran-Proteinen und ihr Einbau in Lipidmembranen ein noch unvollständig gelöstes Problem darstellt, werden zum Studium von Porenstrukturen kleinere Moleküle, z. B. Polypeptide aus Mikroorganismen, in diese Lipidmembranen inkorporiert.
Das Antibiotikum Alamethicin ist eine Substanz, die bezüglich ihrer spannungsabhängigen Porenbildung in planaren Lipidmembranen bislang am ausführlichsten untersucht wurde (44, 151-155). Bei geringen Alamethicin-Konzentrationen in der Membran kann die Aktivität einer einzigen Pore in Form von sprunghaften Änderungen des Membranstromes bei konstanter Membranspannung beobachtet werden. Die Alamethicin-Pore zeigt hierbei ein ganz bestimmtes Muster in den Sprungfolgen: es treten mehrere Stufen in einer festen Sequenz auf, die keine ganzzahligen Vielfache voneinander darstellen. Die Interpretation dieses Phänomens wird durch die Annahme einer Pore variablen Durchmessers, die also mehrere verschiedene Leitwertzustände ausbilden kann, gegeben.
Ein noch ungelöstes Problem ist die Beziehung zwischen der chemischen Struktur und der porenbildenden Funktion des Alamethicin. Hinweise hierüber kann man durch die Untersuchung von natürlichen und synthetischen Analoga erhoffen. Solche natürlichen Analoga stellen z. B. Suzukacillin (45) und die verschiedenen Trichotoxin-Komponenten dar. Im folgenden werden einige Meßergebnisse über die membranmodifizierenden Eigenschaften des durch multiplikative Gegenstromverteilung gereinigten Trichotoxin A-40 beschrieben. Die Messungen mit den derivatisierten Trichotoxin A-40 Komponenten (vergl. Abschn.

+Meinen verbindlichsten Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Doz. Dr. G. Boheim und Herrn Dipl.-Phys. W. Hanke, Universität Bochum, für Messungen und Unterlagen zu diesem Abschnitt aussprechen.

5.3.1.) und anderen natürlichen Trichotoxin Analoga (38) werden zur Zeit durchgeführt, so daß hier noch keine Aussage möglich ist.
Gibt man geringe Mengen des hoch-gereinigten Trichotoxin A-40 zu einer 1 M KCl-Lösung und verfolgt deren modifizierende Wirkung auf eine planare Lipidmembran, so treten kurze und längere Sprünge (Spikes und Bursts) im Membranstrom bei konstanter Membranspannung auf (Abb. 5.5.). Diese Sprünge führen bei der vorgegebenen experimentellen Auflösung der elektronischen Meßapparatur ($\tau < 1$ ms) jedoch nicht zu Haltepunkten im Strom, wie es beim Alamethicin der Fall ist, sondern man beobachtet schnelle Schwankungen ohne Anzeichen definierter Niveaus.+

+Eindeutige Leitfähigkeitsniveaus im Fluktuationsbild einer einzelnen Pore waren mit einer aus Trichoderma viride NRRL 5242 in kleinen Mengen isolierten Probe gewonnen worden, die unsere Pilzkultur ganz zu Anfang produziert hatte (46). Alle nachfolgenden, von G. Irmscher selbst (16, 37) sowie die in vorliegender Arbeit durchgeführten Isolationen im Grammaßstab, ergaben reproduzierbar ein Peptid gleichbleibender Zusammensetzung (=Trichotoxin A-40). Mit Ausnahme der in (46) durchgeführten Bilayer-Experimenten, wurden alle publizierten Untersuchungen mit diesem Peptid durchgeführt. Die Isolation von Trichotoxin A-40 aus dem Mycel des Pilzes nach den in Abb. 2.3. und Abb. 2.4. gegenübergestellten Methoden, ergibt in jeder Beziehung, auch in Hämolyse- und Bilayer-Experimenten, identische Peptide. Eine Erklärung wäre, daß in einem sehr frühen Stadium der Kulturanzucht eine Mutation von Trichoderma viride NRRL 5242 erfolgte, die zu einer chemischen Modifikation des Polypeptidantibiotikums führte, welche die zu beobachtende Instabilität der Porenstruktur erklärt. Einen Hinweis darauf lieferte die dünnschichtchromatographische Untersuchung einer noch in geringen Mengen vorhandener Originalprobe, die für Bilayer-Experimente in (46) verwendet wurde. Der R_F-Wert dieser Probe unterscheidet sich von derjenigen des vorstehend sequenzierten Trichotoxin A-40.

Führt man das gleiche Experiment mit Trichotoxin A-40 durch, welches partiell hydrolysiert wurde (d. h. ein Gemisch von intaktem Trichotoxin A-40 und daraus erhaltenen Fragmenten darstellt (vergl. Abschn. 4.3.), so treten im Fluktuationsbild Stromniveaus auf, die eine bestimmte Zeit bevorzugt angenommen werden (Abb. 5.6.). Zum Vergleich ist die Lage der Leitfähigkeitszustände der Alamethicin Pore in Abb. 5.6. eingezeichnet. Es ist danach ersichtlich, daß eine größere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Nähe dieser Zustände für das Trichotoxin-System besteht. Es scheint somit der Effekt vorzuliegen, daß die durch Trichotoxin A-40 gebildeten, ionenleitenden Strukturen durch Wechselwirkung mit den eigenen Hydrolyseprodukten stabilisiert werden.

Im folgenden war die Frage zu untersuchen, ob eine Spannungsabhängigkeit der durch die reine Trichotoxin A-40-Komponente induzierten Leitfähigkeit vorhanden war. Hierzu wurde eine Strom-, Spannungskennlinie nach Zugabe von 1 $\mu g\ cm^{-3}$ Trichotoxin A-40 zur wässrigen Salzlösung aufgenommen. Abb. 5.7. zeigt, daß unter diesen Bedingungen die für das Alamethicin-System typische, an eine Diodenkennlinie erinnernde Charakteristik mit steilem Stromanstieg bei nur geringer Spannungserhöhung auftritt. Die halblogarithmische Auftragung der Leitfähigkeit gegen die Membranspannung liefert eine Geradenbeziehung (Abb. 5.8.). Dies bedeutet, daß auch hier, wie beim Alamethicin (155), die durch das Antibiotikum induzierte Leitfähigkeit exponentiell von der Membranspannung abhängt. Der die Steilheit der Geraden charakterisierenden Parameter α ergibt sich zu $\alpha = 2.7$ (vergl. Abb. 5.8.). Der Vergleich mit der Spannungsabhängigkeit anderer analoger Moleküle liefert für Alamethicin F- 30 $\alpha = 5.9 - 6.4$ (155) und für die anfängliche (vergl. Fußnote vorhergehende Seite) Trichotoxin-Probe $\alpha = 3.2 - 4.3$.

Dies zeigt, daß das reine Trichotoxin A-40 bezüglich der Spannungsabhängigkeit der Porenbildung recht gut mit der anfänglichen Trichotoxin-Probe (46) zu vergleichen ist.

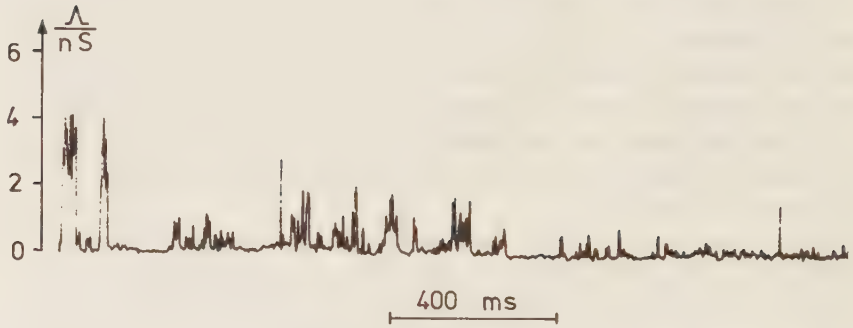


Abb. 5.5. Leitfähigkeitsfluktuationen einer planaren Lipidmembran nach Zugabe geringer Mengen Trichotoxin A-40 zur wässrigen Salzlösung

Membranlipid: 1-Stearoyl-3-myristoyl-glycerin-phosphoryl-cholin+

Membranbildungsverfahren: Montal-Mueller-Methode (156)

Membranfläche: 1.7×10^{-4} cm^2

Salzlösung: 1 M KCl, pH 5.8

Antibiotika-Konzentrationen: 20 ng ml^{-1} Trichotoxin A-40, einseitig (auf der Seite des positiveren Potentials)

Temperatur: 32 °C

Membranspannung: 50 mV

+Das Lipid wurde von Herrn Dr. Hj. Eibl, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, synthetisiert.

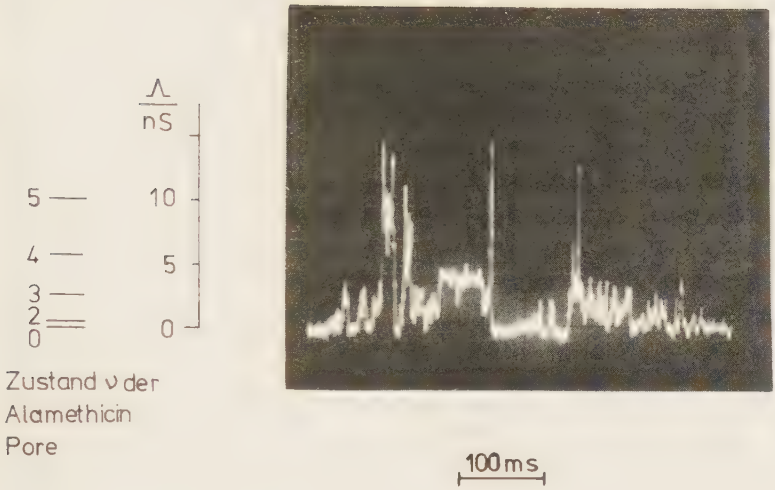


Abb. 5.6. Leitfähigkeitsfluktuationen einer planaren Lipidmembran nach Zugabe geringer Mengen Trichotoxin A-40 mit Hydrolyseprodukten zur wässrigen Salzlösung (Hydrolysebedingungen: Trichotoxin A-40 3 h bei 37 °C mit wasserfreier Trifluoressigsäure behandelt, anschließend zweimal lyophilisiert). Zum Vergleich ist die Lage der Leitfähigkeitszustände ν = 2,3,4,5 der Alamethicin Pore unter identischen experimentellen Bedingungen gezeichnet.

Membranlipid: 1-Stearoyl-3-myristoyl-glycerin-phosphoryl-cholin

Membranbildungsverfahren: Montal-Mueller-Methode (156)

Membranfläche: 1.7×10^{-4} cm^2

Salzlösung: 2 M KCl, pH 5,8

Antibiotika-Konzentration: 30 ng ml^{-1} Trichotoxin A-40 mit Hydrolysenprodukten, einseitig (auf der Seite des positiveren Potentials)

Temperatur: 30 °C

Membranspannung: 30 mV

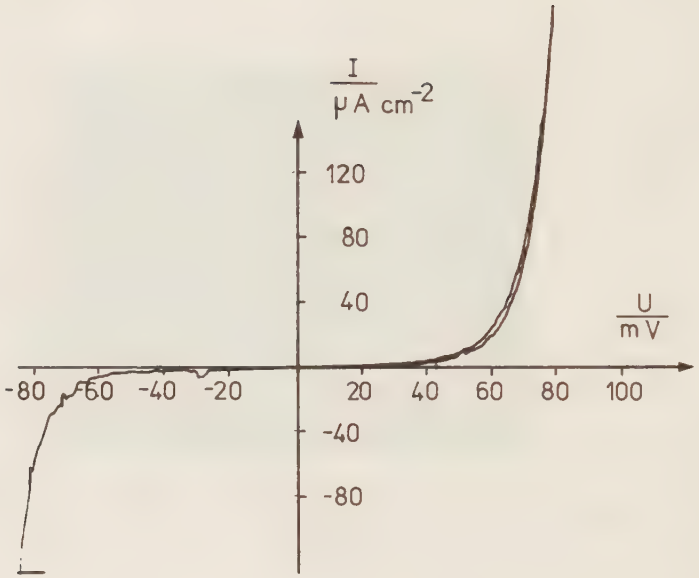


Abb. 5.7. Strom-, Spannungskennlinie einer planaren Lipidmembran nach Zugabe von Trichotoxin A-40 zur wässrigen Salzlösung

Membranlipid: 1-Stearoyl-3-myristoyl-glycerin-phosphoryl-cholin

Membranbildungsverfahren: Montal-Mueller-Methode (156)

Membranfläche: 1.7×10^{-4} cm^2

Salzlösung: 1 M KCl, pH 6.8

Antibiotika-Konzentration: 1 $\mu g\ ml^{-1}$ Trichotoxin A-40, einseitig (auf der Seite des positiveren Potentials)

Temperatur: 32 °C

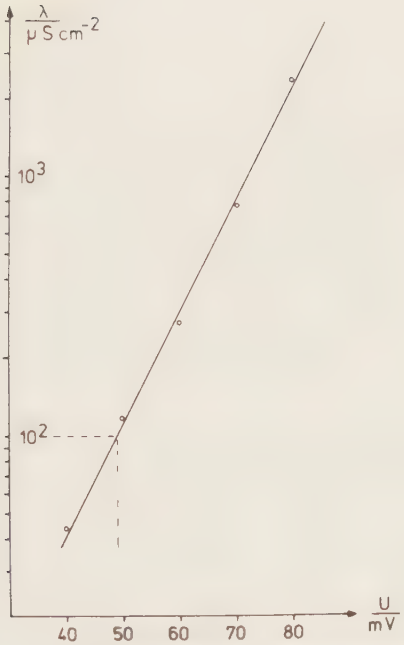


Abb. 5.8. Leitfähigkeits-, Spannungskennlinie der durch Trichotoxin A-40 modifizierten Membran in Abb. 5.7. (positiver Spannungsbereich). Die in halblogarithmischer Auftragung resultierende Gerade läßt sich durch zwei Parameter charakterisieren:

1. V_c ($\lambda = 100\ \mu S\ cm^{-2}$) = 49 mV,

2. $$\alpha = \frac{RT}{F} \cdot \ln 10 \cdot \frac{\log (\lambda_1/\lambda_2)}{U_1 - U_2} \approx 2.7 .$$

Hierbei bedeuten V_c den Spannungswert, bei dem die modifizierte Membran die Leitfähigkeit $\lambda = 100\ \mu S\ cm^{-2}$ annimmt, und α einen die Steigung der Geraden beschreibenden Wert, der entsprechend dem Ansatz $\lambda \sim e^{\alpha \frac{FU}{RT}}$ für die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit bestimmt wurde.

Schlußfolgerungen:

Das hoch-gereinigte Trichotoxin A-40 induziert in planaren Lipidmembranen etwas überraschend ionenleitende Strukturen, deren isoliertes Verhalten innerhalb der Zeitauflösung der experimentellen Apparatur nicht beobachtet werden konnte, deren Spannungsabhängigkeit jedoch mit der Spannungsabhängigkeit anderer Alamethicin-Analoga vergleichbar ist. Hierdurch ist es sehr wahrscheinlich, daß ebenso die ionenleitenden Strukturen, d.h. Poren mit statistisch variierenden Durchmessern, identisch sind. Der Effekt von Partialhydrolysaten auf diese Poren, der zu ihrer Stabilisierung zu führen scheint, zeigt in die gleiche Richtung. Die Pore kann mehrere Zustände annehmen, deren Leitwerte nicht ganzzahlige Vielfache voneinander sind (Abb. 5.6.). Ursachen für die Instabilität der Porenstrukturen von hoch-gereinigtem Trichotoxin A-40 sind möglicherweise das im Vergleich zu Alamethicin in der Mitte des Moleküls fehlende Glycin, sowie die insgesamt stärkeren lipophilen Eigenschaften des Trichotoxin. Alle sonstigen für die stabile Porenbildung des Alamethicin strukturell erforderlichen Gruppen sind bei beiden Antibiotika vorhanden (157). Durch eine Hochreinigung der Alamethicin-Komponenten und durch deren Aktivitätstest besteht nun die Möglichkeit, diejenigen Strukturmerkmale aufzufinden, die zu einer Stabilisierung der für die Alamethicin-Analoga typischen Porenstruktur führen.

6. Sekundärstruktur und Aktivität

Durch die Kenntnis der vollständigen Sequenz des Trichotoxin A-40 sind zusammen mit den in den vorhergehenden Abschnitten durchgeführten Untersuchungen, sowie durch Vergleich mit den natürlichen Analoga des Trichotoxin und synthetischen Modellpeptiden allgemeine Aussagen über die Konformation und strukturellen Erfordernisse zu den membranmodifizierenden Aktivitäten dieser Verbindungen möglich.

Die Polypeptide benötigen eine Mindestlänge von etwa 18 Aminosäuren, davon 50 % der helikale Konformationen stark begünstigenden α-Aminoisobuttersäure.

Eine Blockierung des N-Terminus durch den Acetylrest und des C-Terminus durch den Aminoalkohol scheint nicht unbedingt erforderlich zu sein.
Essentiell ist ein N-terminaler Bereich von etwa 12 Aminosäuren, dessen helikaler Konformationsteil im engeren Sinne etwa 6-7 Aminosäuren einschließt. Dieser wird vermutlich stabilisiert durch einen etwa die ersten drei Aminosäuren umfassenden und den Acetylrest einbeziehenden ß-Turn. Im C-terminalen Helixteil sind die Wasserstoffbrücken weniger starr fixiert ("aufgeweichte" Helix).
Die hämolytische Aktivität ist bei den mehr polaren Analogen herabgesetzt unabhängig davon, ob die polare Gruppe sich innerhalb des helikalen Teiles des Moleküls oder im C-Terminus befindet.

Alle hämolytisch wirkenden Verbindungen zeigen in Bilayer-Experimenten eine membranporenbildende Wirkung; Alamethicin in Form stabiler, gut auflösbarer Porenzustände, Trichotoxin A-40 und in noch stärkerem Maße das synthetische Nonadekapeptid (vergl. Abb. 5.4.) in Form von Spikes und Spikesfolgen, sogenannten Bursts. Der helikale Anteil der Peptide wird beim Einschieben in die Membran größer.

Bei allen membranporenbildenden, und damit einen spannungsabhängigen Leitwert zeigenden, Peptiden wird der helikale Bereich durch Prolin unterbrochen. Daran schließt sich ein C-terminaler Bereich an mit 5-6 Aminosäuren, der in einer überwiegend ungeordneten Struktur (random coil) vorliegt.

In den Abbildungen 6.1. und 6.2. wurde eine von mehreren möglichen Sekundärstrukturen einer Sequenz des Trichotoxin A-40 dargestellt. Die Bilder geben einen Eindruck von der dem als α-Helix dargestellten N-terminalen und dem in weniger geordneter Struktur vorliegenden C-terminalen Teil des Moleküls wieder. Eine Konformation mit 3_{10}-helikalen Strukturanteilen (vergl. oben) ist jedoch gleichfalls in Erwägung zu ziehen.

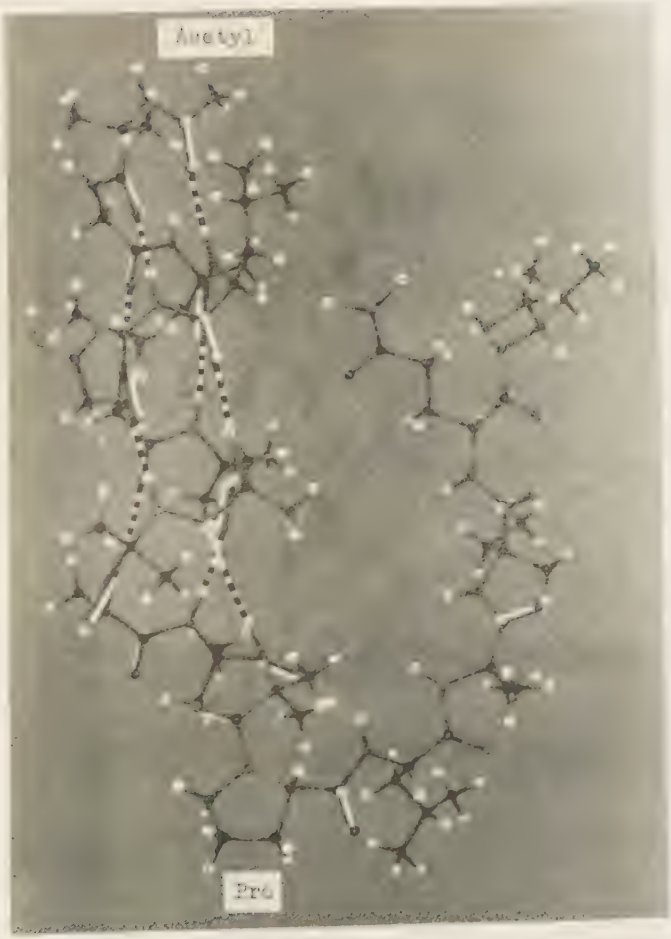


Abb. 6.1. Mögliche Konformation der Sequenz des Trichotoxin A-40: Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol

Zur Diskussion der Art der Helix vergleiche vorhergehenden Text.

Verwendung fanden Molekülmodelle von Cochranes of Oxford Ltd., Leafield, Oxford, England

Gestrichelt = Wasserstoffbrückenbindungen in α-helikaler Anordnung

Abb. 6.2. Konformation der in Abb. 6.1. dargestellten Sequenz des Trichotoxin A-40 unter Verwendung von CPK - Molekülmodellen

7. Experimenteller Teil

7.1. Isolierung von Trichotoxin A-40 aus Trichoderma viride, NRRL 5242

7.1.1. Kultur von Trichoderma viride NRRL 5242

Die Anzucht des Pilzes erfolgte in Anlehnung an die von G. Irmscher (16) angegebene Methode:
Der Pilzstamm Trichoderma viride NRRL 5242 wurde als Lyophilisat vom United States Department of Agriculture Research Service, Peoria, Illinois, USA, bezogen. Ein Teil desselben wurde unter sterilen Bedingungen auf 10 sterilisierte Schrägagarröhrchen ausgestrichen, welche folgendes Aussaat-Medium (162) enthielten:

5 g Pharmamedium (Trader Protein Division of Traders Oil Mill Company, Forth Worth, Texas, USA),
5 g Cerelose (CPC International Inc., Industrial Division),
4 g Agar,
200 ml entionisiertes Wasser.

Nachdem mittels 10 proz. Kaliumcarbonatlösung auf pH 6.8 eingestellt worden war, wurde die Mischung 3 h im siedenden Wasserbad gehalten und anschließend in noch heißem Zustand in Reagenzgläser abgefüllt. Diese wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert und in schräger Stellung erkalten gelassen. Nach achttägiger Inkubation im dunklen Kulturraum bei 27 °C war die Auskeimung und Spoulation des Pilzes beendet, was an der Bildung einer grünen Sporenschicht über dem anfänglich weißen Myzelrasen erkenntlich war. Die angeimpften Gläser konnten für einige Monate im Kühlraum (-15 °C) aufbewahrt werden.
Durch Abschwemmen mit autoklaviertem, entionisierten Wasser erhielt man etwa 50 ml Sporensuspension mit einer Dichte von etwa 5×10^8 Sporen pro ml (16). 35 ml dieser Suspension wurde in Portionen von 0.5 ml bei -30 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die restlichen 15 ml wurden zum Animpfen von 15 Fernbachkolben verwendet (Volumen 1800 ml, konische Form). Jeder

Kolben enthielt 500 ml Raulin - Thom - Medium (163). Zur Herstellung desselben wurde wie folgt vorgegangen: in 7.5 l entionisiertem Wasser wurden gelöst: 375 g D-Glucose, 20 g L-Weinsäure, 20 g Diammoniumtartrat, 1.2 g Ammoniumsulfat, 3 g Diammoniumhydrogenphosphat, 3 g Kaliumcarbonat, 2.5 g Magnesiumhydroxidcarbonat, 0.35 g Eisen(II)-sulfat x 7 H_2O und 0.35 g Zinksulfat x 7 H_2O.
Dieses Nährmedium wurde 20 min bei 120 °C autoklaviert. Nach dem Animpfen unter Verwendung sterilisierter Pipetten wurden die Fernbachkolben 11 - 14 Tage bei 27 °C im Dunkeln stehen gelassen. Dann wurde die mit einer grünen Sporenschicht überzogene Myzelmatte abgeerntet, in Edelstahlschalen lyophilisiert und mit einer Schlagmühle pulverisiert.
Zum Beimpfen späterer Kulturen wurden 0.5 ml der tiefgefrorenen Sporensuspension aufgetaut und unter sterilen Bedingungen auf 4 Schrägagarröhrchen übertragen. Nach 5 - 8 Tagen (vergl. oben) wurden die Sporen mit insgesamt 30 ml sterilem, entionisierten Wasser abgeschwemmt und 30 Fernbachkolben mit je 1 ml dieser Suspension beimpft. Die Verwendung solchermaßen frisch herangezogener Sporen wirkte beschleunigend auf den Verlauf der Pilzkultur (162).
Vor häufigem Umsetzen der Trichoderma viride Stämme wird allerdings gewarnt, da sie leicht degenerieren.

7.1.2. Optimierung der Isolierung von Trichotoxin aus dem Mycel von Trichoderma viride

126 g trockenes Myzelpulver wurde in die Hülle eines 1 Liter Soxhlet-Extraktors gefüllt und bei 75 °C Badtemperatur mittels 1.6 Liter Dichlormethan extrahiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Flüssigkeitsspiegel des Extraktionsmittels stets über dem Niveau des Triglykolbades blieb. Nach 18 stündiger Extraktionsdauer wurde das Dichlormethan am Wasserstrahlvakuum bei 40 °C Badtemperatur eingeengt, wobei etwa 18 g eines braunen Öles zurück blieben. Dieses wurde 4 mal mit je 20 ml Methanol jeweils ca. 5 min gerührt. Die methanolischen Phasen

wurden vom sich abscheidenden dunkelbraunen Öl abgetrennt und vereinigt. Beim Stehenlassen dieser methanolischen Phasen schied sich nach einiger Zeit noch mehr unlösliches Material aus. Dieses wurde abzentrifugiert und 3 mal mit je 20 ml Methanol gewaschen. Aus allen vereinigten methanolischen Phasen erhielt man nach dem Eindampfen 4.0 g braunes Pulver.

7.1.3. Sephadex LH-20-Gelchromatographie

4.0 g des vorerwähnten Rohextraktes wurden in 20 ml Methanol gelöst und über eine mit Methanol equilibrierte, mit Sephadex LH-20 gefüllte Säule chromatographiert (5 x 80 cm, Hersteller Fa. Pharmacia, Schweden). Nachdem ein als Verunreinigung vorauslaufender gelber Farbstoff den Auslauf der Säule erreicht hatte, wurden mittels eines Fraktionssammlers 10 ml Portionen aufgefangen. Erscheinen und Reinheit des eluierten Trichotoxin wurde dünnschichtchromatographisch durch Auftropfen von je 15 µl Probelösung auf Kieselgel-Fertigplatten im System VI durch Ansprühen mit Wasser und Anfärben mit TDM-Reagens ermittelt. Trichotoxin A-40 und A-50 (die zusammen eluiert werden), fielen hierbei bereits in großer Reinheit (frei von anderen peptidischen Verunreinigungen, Anwesenheit von etwas fetthaltiger Verunreinigung) an. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und eingedampft. Man erhielt 190 mg eines schwach hellbraun gefärbten Pulvers.

7.1.4. Multiplikative Gegenstromverteilung zur Trennung von Trichotoxin A-40 und A-50

Das zur Gegenstromverteilung verwendete System wurde wie folgt hergestellt: 1 ml konz. Ammoniaklösung (≙ 25 %) wurde mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Durch Zutropfen von 0.1 n Essigsäure wurde am pH-Meter genau pH 8.9 eingestellt. Zu dieser Lösung wurde ein gleichgroßes Volumen 2-Butanol gegeben, 30 min gerührt und im Scheidetrichter die Ober- von der

Unterphase getrennt. Das verwendete 2-Butanol wurde zuvor über eine 1 m Kolonne rektifiziert.
Zur Trennung von 3.6 g nach der Sephadex-LH-20-Gelchromatographie erhaltenem Trichotoxin in die Komponenten A-40 und A-50 fand eine Craig-Apparatur mit 220 Elementen von je 10 ml Verwendung (Hersteller: Fa. Labortec, Münchenstein/Basel, Schweiz). Diese wurde wie folgt beschickt: die ersten 5 Elemente wurden mit je 10 ml Ober- und Unterphase gefüllt. Auf die darauffolgenden 15 Elementen wurden 3.6 g in 150 ml Oberphase gelöstes Trichotoxin in 10 ml Portionen verteilt und je 10 ml Unterphase zugegeben. Es wurde über insgesamt 625 Stufen verteilt, wobei die Trennung der Komponenten A-40 und A-50 durch Probenahme der Oberphase dünnschichtchromatographisch im System VIII verfolgt wurde (eine ähnlich durchgeführte Craig-Verteilung zeigt Abb. 2.1.). Die Verteilungskoeffizienten wurden aus der Anfärbeintensität der Dünnschichtchromatogramme mit TDM geschätzt: $K_{A-40} \sim 4$, $K_{A-50} \sim 10$.

Nach Beendigung der Trennung wurden Fraktionen entsprechender Reinheit vereinigt und am Wasserstrahlvakuum bei 40 °C Badtemperatur im Vakuum zur Trockene eingeengt. Beim anschließenden Trocknen am Hochvakuum bei 45 °C sublimiert ein Großteil des aus dem Verteilungssystem stammenden Ammoniumacetates ab. Der Rückstand wurde in tert.-Butanol aufgenommen, mit 0.1 n Essigsäure auf pH 4 angesäuert und sofort lyophylisiert. Nach Lösen des Lyophilisates in 80 proz. wässrigem tert.-Butanol wurde abermals lyophilisiert.
Trichotoxin A-40 wurde hierbei als weißes, fettfreies, in allen verwendeten Dünnschichtsystemen (vergl. Abschn. 7.3.) völlig einheitliche Substanz erhalten. Trichotoxin A-50 kann fettfrei durch eine weitere Gegenstromverteilung im System Petrolether (60-90 °C)/Essigester/Methanol/0.3 proz. Ammoniumacetatlösung (4:14:3:6, v/v) erhalten werden, wobei zugleich eine Separierung in durch Mikroheterogenität verursachte Sequenzanaloge eintritt (38, 39).

7.2. Aminosäureanalysen

Etwa 125 nmol Peptid wurde in 300 µl 6 n HCl gelöst und 18 h bei 110 °C in zugeschmolzenen Glasampullen der Größe 4x0.5 cm hydrolysiert.
Zur Ermittlung der erforderlichen Hydrolysedauer wurden verschieden lang hydrolysiert (6 n HCl/110 °C) und das Verhältnis der Aminosäuren, bezogen auf Leu, bestimmt. Übereinstimmend mit der Literatur (PAYNE et. al. 20 h/105 °C, OVCHINNIKOV et. al. 15 h/110 °C; jeweils 6 n HCl) erwies sich eine Hydrolysedauer von 18 h als ausreichend. Die Bestimmung der Aminosäureverhältnisse bei 18, 49, 72, 97, 120 und 144 h ergab keine signifikant voneinander abweichende Werte. Hydrolyse im Vakuum oder unter Lufteinschluß hatten keinen merklichen Einfluß auf den Aminosäuregehalt. Nach dem Eindampfen unter Verwendung eines Rotationsverdampfers wurde der Rückstand in Natriumcitrat-Puffer (pH 2.2) gelöst und die Aminosäurezusammensetzung mit den automatischen Aminosäureanalysatoren Biotronik LC 6000 E und in einigen Fällen Beckman-Unichrom bestimmt. Da α-Aminoisobuttersäure, Isovalin und Valinol nicht in handelsüblichen Testmischungen für Aminosäureanalysatoren enthalten sind, und um die im Trichotoxin vorliegenden Verhältnisse möglichst genau zu simulieren, wurde folgende Testmischung zusammengestellt:

Glu(2), Pro(1), Gly(1), Ala(2), Aib(10), Iva(1), Leu(2), NH_4^+(1), Vol(~1)

Hierzu wurden je 0.1 mmol L-Pro, Gly, DL-Iva, DL-Vol, 0.5 mmol $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 mmol L-Glu, L-Ala, L-Leu sowie 10 mmol Aib in einem Meßkolben unter Zusatz von 50 ml 0.01 n HCl zum Liter gelöst. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 10 ml lyophilisiert und der Rückstand in 10 ml Natriumcitrat-Puffer (pH 2.2) gelöst. 200 µl dieser Lösung wurden jeweils als Test auf den Biotronik Aminosäureanalysator aufgetragen und enthielten folgende Mengen an Aminosäuren:

Pro, Gly, Iva, Vol, NH_4^+ je 20 nmol, Glu, Ala, Leu je 40 nmol und Aib 200 nmol (vergl. Abb. 3.3.).
Für gaschromatographische Vergleichszwecke wurde das Lyophilisat der obigen Stammlösung verwendet. Der solchermaßen hergestellte Test wiederum wurde durch handelsübliche fertige Aminosäuretestmischungen und Gehaltsbestimmungen von synthetischen Peptiden überprüft. Die Aminosäureverhältnisse der in (110) synthetisierten Peptide wurde mit dieser Testmischung ermittelt und ergaben die erwarteten Aminosäurewerte, auch für Aib. Eine Überprüfung des bei der Herstellung des Testes eingesetzten öligen DL-Valinol durch eine mit L-Valinol-hydrochlorid (kristallin) hergestellten Testlösung ergab einen Gehalt von nur 70 %; deshalb wurde in den Prolylpeptiden (vergl. Tab. 4.8.) ein entsprechend zu hoher Valinol-Gehalt gefunden.

7.3. Dünnschichtchromatographie

Die in diesem und den nächsten Abschnitten erwähnten Chemikalien wurden von den Firmen Merck/Darmstadt und Fluka/Buchs bezogen. Bei letzterer ist auch 4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan erhältlich. Lösungsmittel wurden, sofern nicht p.a. von diesen Firmen bezogen, nach üblichen Methoden absolutiert (164).
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} der Firma Merck/Darmstadt verwendet.

Die R_F-Werte wurden in frisch hergestellten Fließmittelsystemen in mit Fließpapier ausgelegten, gesättigten Kammern (Hersteller Firma Camag/Muttenz, Schweiz) ermittelt. Es wurden in der Regel 2 µl einer 1 proz. Lösung (bei stark anfärbenden Substanzen 0.5 proz. Lösung) aufgetragen. Insbesondere für die Trennung von Partialfragmenten des Trichotoxin A-40 bewährte sich strichförmiges Auftragen mittels einer Kapillare unter Verwendung des Fließmittes I.

Folgende Sprühreagentien wurden verwendet:

a) Wasser: Nach dem Besprühen der Dünnschichtplatte mit Wasser und vorsichtigen Antrocknen mit dem Kaltluftstrom eines Föhns hoben sich lipophile Peptide und Lipide deutlich als weiße Flecke vom noch feuchten Untergrund ab.

b) Ninhydrin: 0.5 g Ninhydrin wurden in 10 ml 1-Butanol unter Zusatz von 3 ml Eisessig gelöst (107).

c) TDM-Reagens (4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan (109):
I 7.5 g TDM wurden in 30 ml Eisessig gelöst, mit 150 ml Wasser verdünnt und filtriert
II 15 g KJ wurden in 300 ml Wasser gelöst
Nach Mischen von I und II ist das Reagens verwendbar und hält sich unzersetzt einige Wochen bei +5 °C.
Zur Durchführung der Anfärbung wurden die trockenen Dünnschichtplatten mit heißem Wasserdampf (Becherglas, Tauchsieder) equilibriert, dann 5-10 min in einen mit Chlorgas gefüllten Exsiccator gelegt und anschließend ca. 5 min kalt geföhnt, um den größten Teil des adsorbierten Chlorgases zu entfernen. Nach dem Sprühen mit TDM erscheinen Peptide als grünblaue Flecken deren Intensität nach einigen Minuten, besonders bei leichtem Erwärmen oder unter UV-Licht, ein Maximum erreicht. Die Flecken von in Aluminium-Folie eingewickelten Platten sind einige Tage gut sichtbar, bevor eine Dunkelfärbung des Untergrundes einsetzt.
In Anbetracht früher beschriebener Schwierigkeiten bei der Anfärbung amphiphiler Polypeptid-Antibiotika mit dem (zudem noch cancerogenen) Chlor-o-Tolidin-Reagens, stellt das TDM eine wertvolle Bereicherung der Anfärbereagentien dar.

d) Isatin: Hierzu wurde in Abwandlung einer Vorschrift in (107) eine 2 proz. Lösung von Isatin in Aceton/1-Butanol (7:3, v/v) verwendet. Nach dem Sprühen oder besser Tauchen der Dünnschichtplatten wurde 10 min bei 110 °C getrocknet. Alle Peptide mit freiem N-terminalen Prolin geben intensiv blaue

Flecken auf gelborangem Untergrund.

Die Anfärbreagentien a), b) und c) können nacheinander auf derselben Platte angewandt werden, wenn dieselbe zwischen den einzelnen Anfärbeschritten gut getrocknet wird.

I	Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig	64:25:4:3
II	Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig	40:35:4:3
III	1-Butanol/Eisessig/Wasser	40:10:10
IV	1-Butanol/Eisessig/Wasser	75:7.5:21
V	Essigester/Pyridin/Ameisensäure/Wasser	63:21:10:6
VI	Chloroform/Methanol/Wasser	65:25:4
VII	Phenol/Wasser	75:25 (g/g)
VIII	Chloroform/Methanol/17 proz. Ammoniaklösung	70:35:10
IX	Chloroform/Methanol/17 proz. Ammoniaklösung	20:20:10
X	Isopropanol/Eisessig/Wasser	30:10:10
XI	Methyl-ethyl-keton/Pyridin/Wasser/Eisessig	70:15:15:2

7.4. Kieselgel-Säulenchromatographie

Die im nachfolgenden Abschnitt beschriebene Trennung der nach selektiver Acidolyse des Trichotoxin A-40 enthaltenen Partialsequenzen, wurde durch Flüssigkeits-Chromatographie mit Kieselgel-Fertigsäulen durchgeführt (Hersteller Firma Merck/ Darmstadt, Lobar-Fertigsäulen, Größe A-C, Kieselgel 60).
Die Säulenchromatographie wurde unter Benützung einer Duramat-Membranpumpe im Kühlraum bei +7 ^{o}C und Verwendung entsprechend temperierter Systeme ausgeführt. Das zu trennende Substanzgemisch wurde jeweils in einem möglichst geringen Volumen des Elutionsmittels gelöst und über eine Probeschleife auf die mit dem entsprechenden Elutionsmittel equilibirierte Säule aufgegeben. Geeignete Fraktionen wurden mit einem Isco-Fraktionssammler aufgefangen.
Die Trennungen wurden dünnschichtchromatographisch (vergl.

Abschn. 7.3.) verfolgt und entsprechende Fraktionen vereinigt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand in tert.-Butanol unter Zusatz von wenig Wasser gelöst und lyophilisiert.

7.5. Acidolyse von Trichotoxin A-40 und Isolierung von Partialsequenzen

Nachstehend wird die Trennung und Charakterisierung der bei Acidolyse des Trichotoxin A-40 erhaltenen Partialsequenzen durch Kieselgel-Säulenchromatographie und multiplikative Gegenstromverteilung beschrieben.
Elutionsmittel für die Säulenchromatographie (Abschn. 7.4.) und Fließmittel für die Kieselgel-Dünnschichtchromatographie (Abschn. 7.3.) waren, sofern nicht ausdrücklich anders vermerkt, jeweils das System Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 65:25:4:3 (v/v).

7.5.1. Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40

500 mg Trichotoxin A-40 wurden in 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und 3 h 15 min im verschlossenen Gefäß bei 37 °C belassen. Anschließend wurde die rotbraune Lösung eingedampft, der Rückstand in CH_2Cl_2 gelöst und abermals zur Trockne eingeengt. Nach zweimaliger Lyophilisation aus tert.-Butanol unter Zusatz von etwas Wasser erhielt man 630 mg hellbraunes Pulver.

7.5.2. Kieselgel-Säulenchromatographie

630 mg des obigen Lyophilisates wurden in 1.8 ml des Elutionsmittels gelöst und über eine Kieselgel-Fertigsäule (Größe C) chromatographiert. Es wurden Fraktionen von 15 ml (Elutionsgeschwindigkeit 0.75 ml/min) aufgefangen. Die Trennung wurde dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von TDM-, Isatin-

und Ninhydrin-Reagens verfolgt. Photos die einen Eindruck dieser Trennung vermitteln, zeigt Abb. 4.6. Weitere Angaben sind aus Tab. 7.1. zu entnehmen.

Tab. 7.1. Fraktionierung und Charakterisierung der durch Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 erhaltenen Partialsequenzen

			Anfärbereagentien:			
Nr.	Elutionsvol. (ml)	Menge (mg)	Isatin	Ninhydrin	TDM	Hauptkomponente
6-10	90-150	117	-	-	+	Ausg.mat. (ca. 20 %)
11-17	151-255	212	-	-	+	Dodekapeptid 1, 2, 3
18-22	256-330	32	-	-	+	Ac-Aib-OH
23-34	331-510	115	blau	gelb	+	N-Prolylpeptid 2 + (1)
35-45	511-675	77	blau	gelb	+	N-Prolylpeptid 1 + (2),
				rotorange	+	Undekapeptid
46-49	676-735	16	-	rot	+	weitergehende Spalt-
50-59	736-855	21	-	rot	+	produkte (z. B. H-Ala-
60-85	886-1275	28	-	rot	+	Aib-Aib-OH)
		618				

7.5.3. Isolierung der N-acetylierten Dodekapeptide 1, 2 und 3

7.5.3.1. Kieselgel-Säulenchromatographie

Die durch Trifluoracetolyse von Trichotoxin und darauffolgende Säulenchromatographie erhaltenen (Abschn. 7.5.2.) Fraktionen 11-17 ergaben nach Vereinigung und Lyophilisation im Dünnschichtchromatogramm folgendes Bild:

Abb. 7.1. Vereinigte Fraktionen 11-17 nach der Trifluoracetolyse und Säulenchromatographie von Trichotoxin A-40 (Abschn. 7.5.2.)

1-3 = Dodekapeptide 1, 2 und 3
4 = Trichotoxin A-40

Alle Flecke in Abb. 7.1. waren nur durch TDM (und Wasser) anfärbbar, nicht durch Ninhydrin und Isatin. Die lipophilste Verbindung war anhand von Referenzmaterial unschwer als Ausgangsmaterial zu identifizieren. Bei den übrigen lag aufgrund der Anfärbereaktion die Vermutung nahe, daß es sich um N-acetylierte Oligopeptide handelt, die durch Abspaltung der zwei Prolylpeptide aus dem Trichotoxin entstanden waren. Daß dies der Fall war, konnte nach weiterer Acidolyse und Identifizierung des dabei entstandenen Ac-Aib-OH gezeigt werden.
Zur weiteren Reinigung wurde nochmals eine Kieselgelsäulenchromatographie (Typ B) durchgeführt. Dadurch konnte das Ausgangsmaterial Trichotoxin A-40 vollständig entfernt werden. Ferner erhielt man zwei Fraktionen von denen die eine aus dem Dodekapeptid 2 mit maximal 10 % Dodekapeptid 3 bestand (Trennung vergl. Abschn. 7.5.3.2.), die andere aus Dodekapep-

Verteilungskoeffizient (K) nach 496 Stufen (Maxima waren nach 496 Stufen noch gut sichtbar, jedoch nicht mehr nach 800 Stufen).

$Max._2 = 135$, $K_2 = 0.37$ Dodekapeptid 2

$Max._3 = 152$, $K_3 = 0.44$ Dodekapeptid 3

Tab. 7.2. Aminosäureanalysen der durch multiplikative Gegenstromverteilung getrennten Dodekapeptide 2 und 3 (Verhältnisse bezogen auf Leucin = R_{Leu}).

Dodekapeptid 2 Abb. 7.2.b: Frakt. 3	R_{Leu}	Dodekapeptid 3 Abb. 7.2.b: Frakt. 8	R_{Leu}
Glu 0.99	1	Glu 0.97	1
Gly 0.83	1	Gly 0.12	0
Ala 1.25	1	Ala 1.82	2
Aib 7.57	8	Aib 7.81	8
Iva -	0	Iva (0.49)	(0)
Leu 1.00	1	Leu 1.00	1
	12		12

Damit war der nach Abschn. 7.5.3.1. zu erwartende Gly⇔Ala-Austausch bestätigt.

tid 2 mit etwa 35 % Dodekapeptid 1 (Trennung vergl. Abschn. 7.5.3.3.).
Eine Aminosäureanalyse des Dodekapeptid 2 (enthaltend maximal 10 % Dodekapeptid 3) ergab folgende Aminosäureanalyse:
Gly (0.68); Leu (1.00); Glu (0.97); Ala (1.45); Aib (7.81); Iva (0.49). Die Nichtstöchiometrie der mit Aminosäureanalysen exakt zu erfassende Gly und Ala deuteten auf einen Austausch dieser Aminosäuren in den beiden Dodekapeptiden hin, der durch GC-MS untersuchungen (vergl. Tab. 4.8.) bestätigt werden konnte. Zur Veranschaulichung des Sachverhaltes seien die nach Abschn. 4.4. ermittelten Sequenzen angegeben:
Dodekapeptid 2:
Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib
Dodekapeptid 3:
Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib

7.5.3.2. Trennung der Dodekapeptide 2 und 3 durch multiplikative Gegenstromverteilung nach Craig

Für weitere Untersuchungen und Charakterisierungen schien es wünschenswert, die Dodekapeptide 2 und 3 vollständig voneinander zu trennen. Bei der Aminosäureanalyse sollte sich dann das Dodekapeptid 3 durch Fehlen des Glycin gegenüber dem Dodekapeptid 2 auszeichnen. Da zwei aufeinanderfolgende Kieselgel-Säulenchromatographie-Läufe zu einer guten Separierung, aber keiner vollständigen Trennung dieser Peptide geführt hatte, wurden Versuche zu einer Craig-Verteilung unternommen.
Craig-Verteilung 1 (Abb. 7.2.):
Substanz: 50 mg Dodekapeptid 2 (enthaltend ca. 10 % Dodekapeptid 3) wurden in ein Rohr einer 3 ml Craig-Apparatur mit 140 Verteilungselementen gegeben.
System: Essigester/2-Butanol/Methanol/0.3 proz. Ammoniumacetatlösung 5:3:2:3 (v/v)
Stufenzahl: Insgesamt 800 Stufen im Kreislauf unter Entnahme und Einfüllen frischer peptidfreier Phasen.
Schüttelbewegungen: 35 pro Stufe; Trennzeit: 3 min pro Stufe

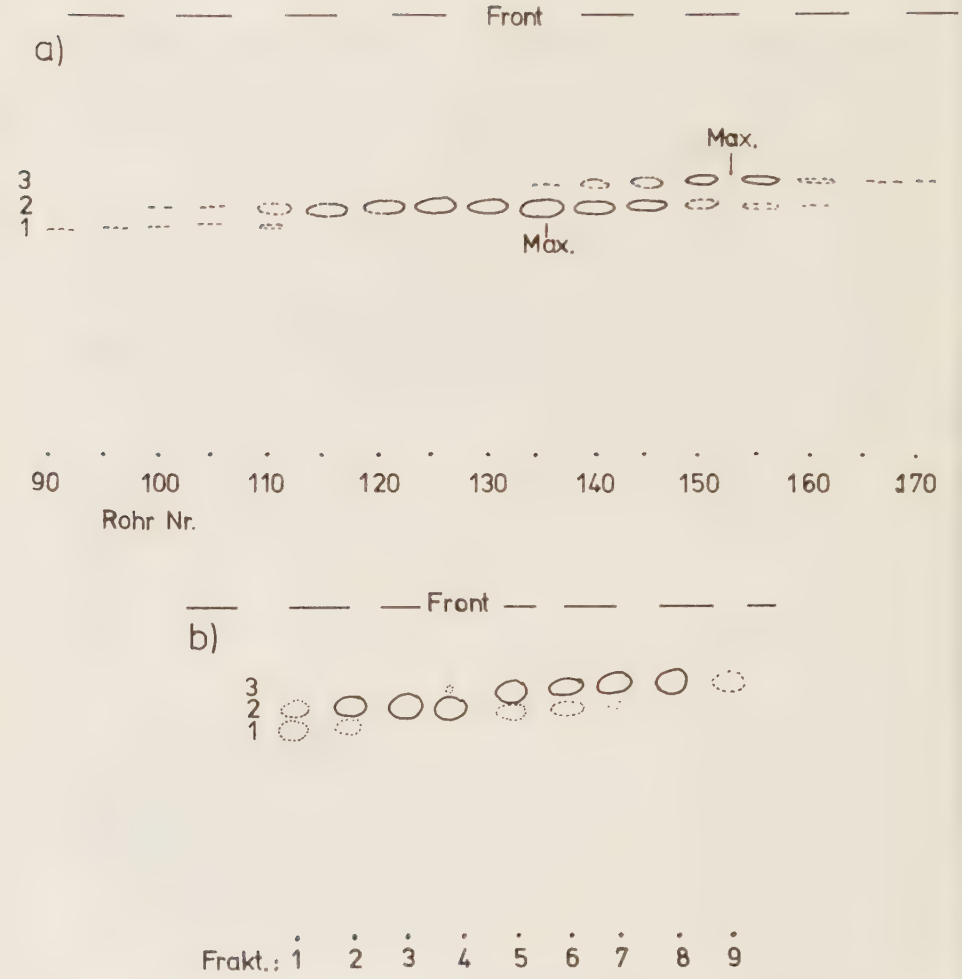


Abb. 7.2.a) Dünnschichtchromatographie der Craig-Verteilung 1 (Abschn. 7.5.3.2.) nach 496 Stufen

Abb. 7.2.b) Desgleichen nach 800 Stufen, Fraktionierung und Lyophilisation

1 % Lösung, 3 µl aufgetragen, Anfärbung mit TDM

1 = Dodekapeptid 1, 2 = Dodekapeptid 2, 3 = Dodekapeptid 3

7.5.3.3. Trennung der Dodekapeptide 1 und 2 durch multiplikative Gegenstromverteilung

In Analogie zur Mikroheterogenität der Dodekapeptide 2 und 3 (Gly-Ala Austausch) war wahrscheinlich, daß sich auch die Dodekapeptide 1 und 2 durch einen Aminosäureaustausch unterscheiden. Deshalb wurde eine Craig-Verteilung in demselben Verteilungssystem wie in Abschn. 7.5.3.2. durchgeführt.

Craig-Verteilung 2 (Abb. 7.3.):

Substanz: 88 mg Dodekapeptid 2 (enthaltend etwa 35 % Dodekapeptid 1; vergl. Abschn. 7.5.3.1.) wurden auf drei Rohre einer 3 ml Craig-Apparatur verteilt.

System: Essigester/2-Butanol/Methanol/0.3 proz. Ammoniumacetatlösung 5:3:2:3 (v/v)

Stufenzahl: Insgesamt 620 Stufen, nach 335 Stufen wurden die Rohre 0-43 und 117-135 entleert, mit frischen Phasen gefüllt und die Apparatur im Kreislauf geschaltet.

Schüttelbewegungen: 35 pro Stufe; Trennzeit: 3 min pro Stufe

Verteilungskoeffizient (K) nach 620 Stufen:

$Max._1 = 126$, $K_1 = 0.26$ Dodekapeptid 1

$Max._2 = 159$, $K_2 = 0.35$ Dodekapeptid 2

Die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen 90-118 (21 mg), 119-128 (11 mg) und 169-199 (19 mg) wurden vereinigt, eingeengt, 2 mal unter Zusatz verdünnter Essigsäure lyophilisiert und nach Totalhydrolyse durch Aminosäureanalyse untersucht (Tab. 7.3.).

Tab. 7.3. Aminosäureanalysen der nach Craig-Verteilung isolierten Dodekapeptide

Dodekapeptid 1 Abb. 7.3.b: Fr. 90 - 118	R_{Leu}	Dodekapeptid 1 Fr. 119-128	Dodekapeptid 2 Fr. 169-199	R_{Leu}
Glu 1.02	1	Glu 1.01	Glu 1.05	1
Gly 0.96	1	Gly 0.97	Gly 0.91	1
Ala 2.04	2	Ala 2.03	Ala 1.14	1
Aib 6.74	7	Aib 6.93	Aib 7.65	8
Iva (0.39)	-	Iva 0.00	Iva -	-
Leu 1.00	1	Leu 1.00	Leu 1.00	1
	12			12

Die Analysen zeigen deutlich, daß sich Dodekapeptid 1 von Dodekapeptid 2 durch Austausch eines Aib gegen Ala unterscheidet.

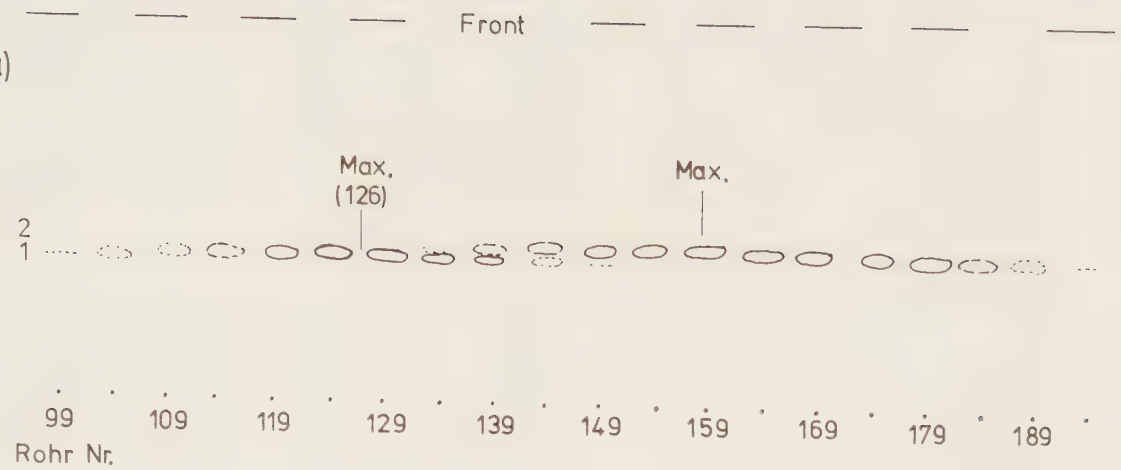


Abb. 7.3.a) Dünnschichtchromatographie der Craig-Verteilung 2 nach 620 Stufen;
1 = Dodekapeptid 1, 2 = Dodekapeptid 2

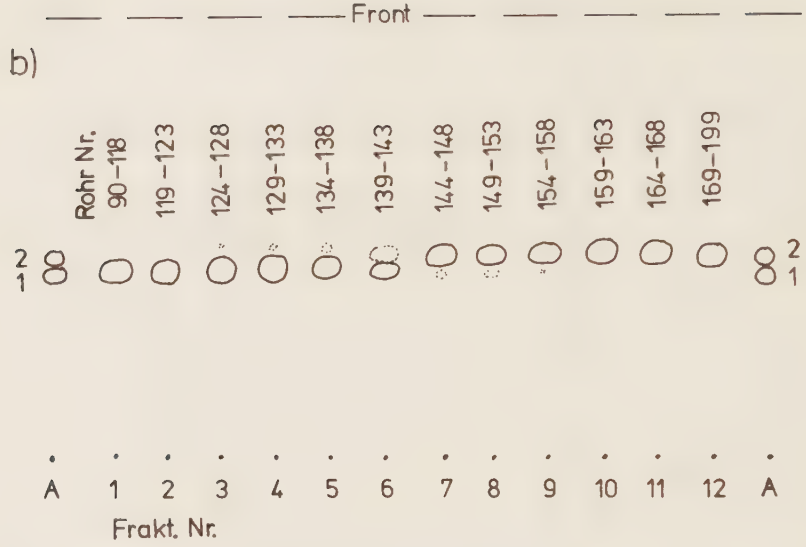


Abb. 7.3.b) Dünnschichtchromatogramm der Craig-Verteilung 2 nach der Fraktionierung und Lyophilisation. Auftragmenge je 3 µl der 1 proz. Lösungen, Anfärben mit TDM.

1 = Dodekapeptid 1, 2 = Dodekapeptid 2, A = Ausgangsmaterial

7.5.3.4. Isolierung des Prolylpeptides 2 durch Kieselgel-Säulenchromatographie

Die durch Trifluoracetolyse von 500 mg Trichotoxin A-40 und anschließende Kieselgel-Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen 23-34 und 35-45 (vergl. Tab. 7.1. und Abb. 4.6.) gaben im Dünnschichtchromatogramm mit Isatin vorwiegend zwei blaue Flecke, die mit Ninhydrin gelb anfärbten. Mit diesen Fraktionen waren außerdem jeweils mit Ninhydrin rot anfärbbare Fragmente eluiert worden, die später für die Sequenzierung Bedeutung erlangten. Im Dünnschichtchromatogramm zeigte die Fraktion 23-34 einen knapp unterhalb des Prolylpeptides 2 laufenden Fleck. Dieser zeigte den gleichen R_F-Wert wie das schon weitgehend abgetrennte Prolylpeptid 1. Diese Verbindung wurde später als das Dipeptid H-Gln-Val identifiziert (Abschn. 7.5.3.8.).

Die Fraktionen 35-45 enthielten zusätzlich zum Prolylpeptid 1 eine etwas hydrophilere Verbindung die mit Ninhydrin deutlich rotorange, mit Isatin schwach rot anfärbbar war. Diese wurde später als Undekapeptid identifiziert (Abschn. 7.5.3.7.).

Nach Vereinigen, Lyophilisieren und abermaligen Auftragen der Fraktionen 23-34 und 35-45 (Tab. 7.1.) zeigte sich im Dünnschichtchromatogramm nachstehendes Bild (Abb. 7.4.).

Abb. 7.4. Dünnschichtchromatographie der nach Abschn. 7.5.2. erhaltenen Fraktionen 23-34 und 35-45

1 = Prolylpeptid 1, 2 = Prolylpeptid 2, 3 = H-Gln-Val, 4 = Undekapeptid

Zur Trennung wurden 115 mg der zu überwiegenden Teil aus dem Prolylpeptid 2 bestehenden Fraktion 23-34 (vergl. Abb. 7.4.) in 500 µl des Elutionssystems gelöst und auf eine Kieselgel-Fertigsäule (Größe B) gegeben. Es wurden Fraktionen von 9 ml aufgefangen (Fließgeschwindigkeit 0.9 ml/min) und die Trennung dünnschichtchromatographisch verfolgt. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und dünnschichtchromatographiert (Abb. 7.5.). Von der reinsten Fraktion 24-35 wurden 37 mg erhalten (Tab. 7.4.).

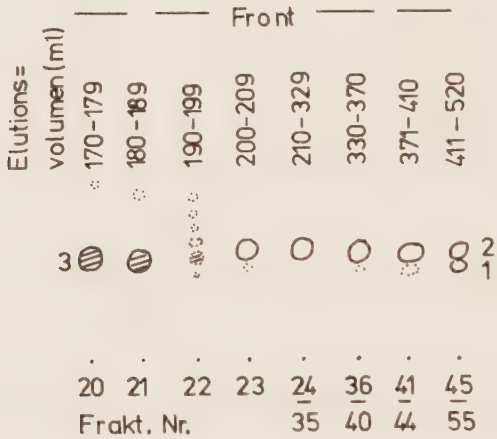


Abb. 7.5. Dünnschichtchromatogramme nach der Isolierung des Prolylpeptid 2 durch Kieselgel-Säulenchromatographie. Auftragmenge je 3 µl einer 0.5 proz. Lösung; Anfärbung mit Ninhydrin.

1 = Prolylpeptid 1, 2 = Prolylpeptid 2, 3 = H-Gln-Vol

(Ein Vergleich mit Abb. 7.4. zeigt die Umkehr der Elutionsfolge des H-Gln-Vol beim Übergang zur Säulenchromatographie).

Tab. 7.4. Aminosäureanalyse des durch Kieselgel-Säulenchromatographie isolierten Prolylpeptides 2 (vergl. Abb. 7.5.).

	Prolylpeptid 2 Abb. 7.5.: Fr. 24-35	R_{Leu}
Glu	0.96	1
Pro	1.05	1
Aib	0.82	1
Iva	1.13	1
Leu	1.00	1
Vol	1.18	1

7.5.3.5. Isolierung der Prolylpeptide 1 und 2 und eines Undekapeptides durch Craig-Verteilung

Die bei der Trifluoracetolyse von 500 mg Trichotoxin A-40 und anschließende Kieselgel-Säulenchromatographie erhaltene Fraktion 35-45 (vergl. Tab. 7.1. und Abb. 7.4.) bestand aus den Prolylpeptiden 1 und 2 sowie einem mit Ninhydrin rotorange anfärbenden Peptid (= Undekapeptid, vergl. Abschn. 7.5.3.7.). Zur Isolierung wurden Versuche zu einer Craig-Verteilung unternommen.

Craig-Verteilung 3 (Abb. 7.6.a)):

Substanz: 77 mg Peptidgemisch (Fraktion 35-45, Tab. 7.1.) wurden in ein Rohr einer 3 ml Craig-Apparatur gegeben.

System: 1-Butanol/Essigester/Ammoniumacetatlösung^{+} (pH 4.6) 2:4.5:5 (v/v)

$^{+}$erhalten aus 2.86 ml Eisessig, 1.925 g Ammoniumacetat und 96 ml Wasser

Stufenzahl: 350

Schüttelbewegungen: 35 pro Stufe, Trennzeit: 3 min pro Stufe

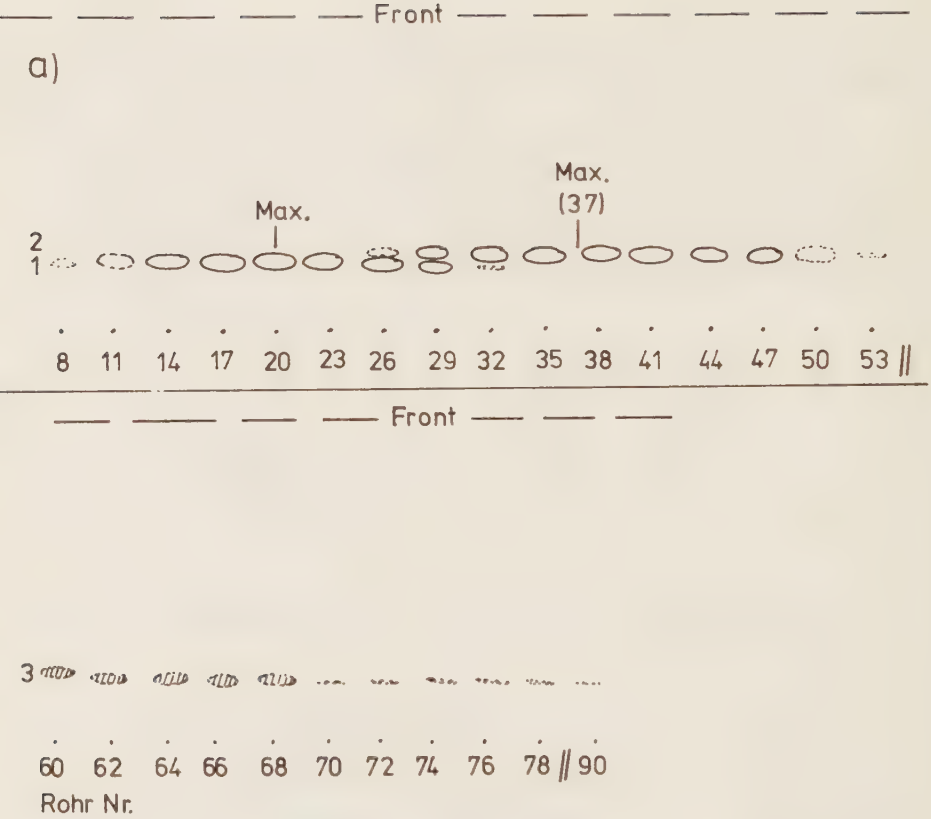


Abb. 7.6.a) Dünnschichtchromatographie der Craig-Verteilung von Fraktion 35-45,(Tab. 7.1.) nach 350 Stufen (aufgetropft jeweils 10 µl Unterphase)

Abb. 7.6.b) dto. Nach Fraktionierung, Eindampfen und Lyophilisation aufgetragen (1 proz. Lösung, 3 µl). Anfärbung mit Isatin und Ninhydrin

1 = Prolylpeptid 1, 2 = Prolylpeptid 2, 3 = mit Ninhydrin rotorange anfärbendes Undekapeptid (gestrichelte Flecken).

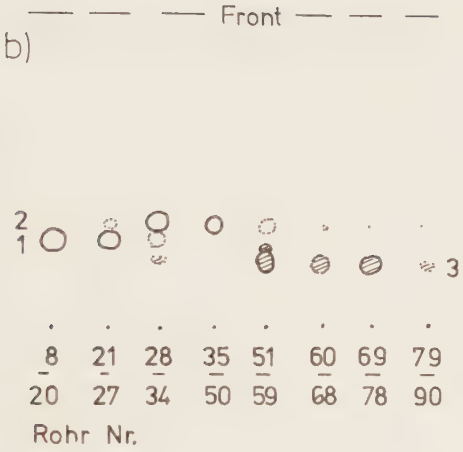


Abb. 7.6.b) Legende vergleiche vorhergehende Seite

Tab. 7.5. Übersicht über die durch Craig-Verteilung 3 getrennter Peptide

Fraktions-Nr. aus Abb. 7.6.b)	Menge (mg)	Zusammensetzung
8 - 20	20	Prolylpeptid 1, rein
21 - 27	n. g.	Überlappung
28 - 34	~13	
35 - 50	27	Prolylpeptid 2, rein
51 - 59	~ 7	Überlappung
60 - 68	6	Undekapeptid
69 - 78	5	
79 - 90	2	

Tab. 7.6. Aminosäureanalysen der bei der Craig-Verteilung 3 isolierten Prolylpeptide 1 und 2
(Undekapeptid vergl. Abschn. 7.5.3.7.)

Prolylpeptid 1	R_{Leu}	Prolylpeptid 2	R_{Leu}
Glu 0.87	1	Glu 0.96	1
Pro 1.03	1	Pro 1.05	1
Aib 1.66	2	Aib 0.82	1
Iva (0.33)	-	Iva 1.13	1
Leu 1.00	1	Leu 1.00	1
Vol 1.11	1	Vol 1.18	1
	6		6

Isolation und Trennung der Prolylpeptide aus Trichotoxin-Partialhydrolysaten mittes Kieselgel-Säulenchromatographie und Craig-Verteilung wurden mehrfach wiederholt. Vorstehend wurde die Isolation größerer Mengen der Peptide für ^{13}C-NMR Untersuchungen dokumentiert. GC-MS - Sequenzierungen wurden an durch Craig-Verteilung erhaltenen Peptiden der folgenden Aminosäurezusammensetzung durchgeführt:

Prolylpeptid 2:
Glu (0.88), Pro (1.07), Aib (0.96), Iva (1.46)$^{+}$, Leu (1.00), Vol (1.05)

Prolylpeptid 1:
Glu (0.81), Pro (1.06), Aib (1.81), Iva (0.40)$^{+}$, Leu (1.00), Vol (1.03)

$^{+}$vergl. Anmerkung in Abschnitt 3.1.2.

Verteilungskoeffizient (K) nach 350 Stufen:

$Max._1$	= 20,	K = 0.06	Prolylpeptid 1
$Max._2$	= 37,	K = 0.12	Prolylpeptid 2
$Max._3$	= 64,	K = 0.25	Undekapeptid

Nach dünnschichtchromatographischer Prüfung (Abb. 7.6.a)) wurde entsprechend fraktioniert, eingedampft, lyophilisiert und die Reinheit der erhaltenen Fraktionen dünnschichtchromatographisch (Abb. 7.6.b) und Tab. 7.5.) und durch Aminosäureanalyse überprüft (Tab. 7.6.).

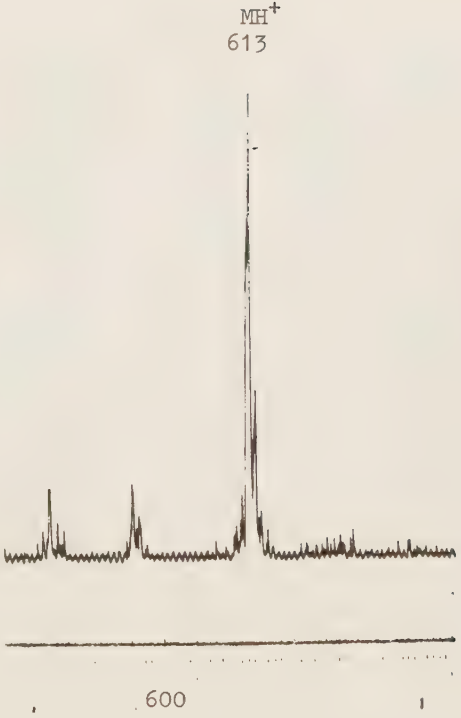
Prolylpeptid 1 und 2 konnten auf diese Weise getrennt und in guter Reinheit erhalten werden.

7.5.3.6. Molmassenbestimmungen der Prolylpeptide 1 und 2 durch Felddesorptions-Massenspektrometrie

Seit der Einführung durch BECKEY und SCHULTEN (166) vor wenigen Jahren, ist die Felddesorptions-Massenspektrometrie eine wichtige Methode zur Bestimmung von Molmassen geworden.
Die Molmassenbestimmung der Prolylpeptide war überwiegend aus zwei Gründen von Interesse:
1. sollte sich der durch Sequenzierung und Aminosäureanalyse nachgewiesenen Iva-Aib Austausch durch einen Unterschied von 14 Masseeinheiten der Molmasse bemerkbar machen
2. war eine prinzipiell denkbare Lactonbildung als Sekundärreaktion bei der Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 zwischen Glx^{17} und Vol^{18} (121) auszuschließen.

In völliger Übereinstimmung mit den zu erwartenden Molmassen für die protonierten Verbindungen wurde für das Prolylpeptid 1 $(MH)^+$ = 613 und für das Prolylpeptid 2 $(MH)^+$ = 627 gefunden (Abb. 7.7.).

7.7.a)



7.7.b)

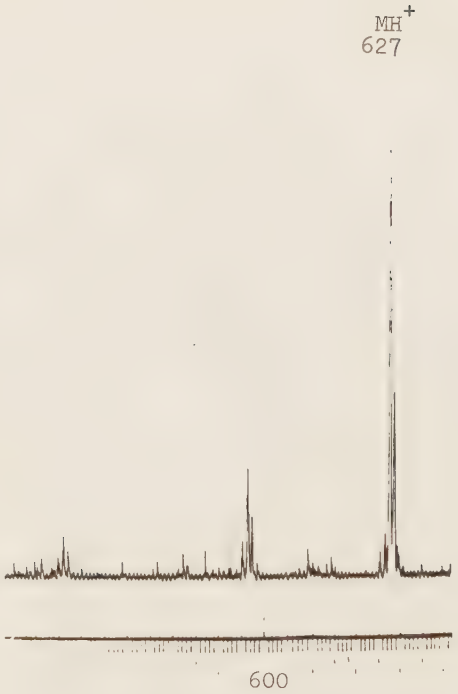


Abb. 7.7.a) Molmassenbestimmung des Prolylpeptides 1 : H-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol

Abb. 7.7.b) Molmassenbestimmung des Prolylpeptides 2 : H-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol

Bedingungen: Felddesorptions-Massenspektrometrie, Ionenquellen-Temperatur: 75 °C

7.5.3.7. Isolierung des Undekapeptides (H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-OH)

Zur Feinreinigung des bei der Craig-Verteilung 3 (vergl. Abschn. 7.5.3.5.) der Prolylpeptide erhaltenen, hydrophileren und mit Ninhydrin rotorange, mit Isatin rot färbenden Peptides wurden 13 mg der Fraktion 60-90 (vergl. Abb. 7.6.b)) über eine Kieselgel-Säule (Größe A) chromatographiert und nach dünnschichtchromatographischer Prüfung fraktioniert (Abb. 7.8.).

Abb. 7.8. Dünnschichtchromatogramm der säulenchromatographischen Reinigung von 13 mg Undekapeptid (Fr. 60-90, Tab. 7.5.); Anfärbung mit Ninhydrin, Fließmittel $\overline{X}$.

Die reinste Fraktion 20-25 ergab 2.2 mg Undekapeptid (Tab. 7.7.).

Tab. 7.7. Aminosäurezusammensetzung des mit der Kieselgel-Säulenchromatographie isolierten Undekapeptides

Undekapeptid		R_{Leu}
Glu	0.99	1
Gly	0.95	1
Ala	0.99	1
Aib	6.55	7
Iva	(0.24)	-
Leu	1.00	1
		11

Dieses Undekapeptid dürfte mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem N-acetylierten Dodekapeptid 2 (Abschn. 7.5.3.1.) durch Abspaltung von Ac-Aib-OH entstanden sein. Auf die Schlüsselrolle dieses Undekapeptides war bereits in Abschn. 4.3. hingewiesen worden.

Auffallend war die rotorange Anfärbung dieses Peptides mit Ninhydrin, die insbesondere nach Chromatographie in Fließmittel X gut zu sehen war. Diese Anfärbung ist im vorliegenden Falle charakteristisch für N-terminales Glycin mit seiner Aminogruppe.

Eine Endgruppenbestimmung mit der Dansyl-Methode nach (165) unter Verwendung von Polyamid-Folien ergab eindeutig Glycin als N-terminale Aminosäure.

Diese Peptid wurde auch durch Solid-Phasen-Edman-Abbau sequenziert (vergl. Abschn. 4.5. und Abb. 4.17.)

Die Festlegung des Glycin in Position 2 des Trichotoxin A-40 und die Ermittlung der Sequenz des vom C-Terminus des Dodekapeptid 1 abgespaltenen Tripeptides H-Ala-Aib-Aib-OH (vergl. Abschn. 7.5.3.10.) erlaubte unter Berücksichtigung der quantitativen Aminosäureanalyse die zweifelsfreie Überlappung der in Tab. 4.8. angegebenen Partialsequenzen.

7.5.3.8. Isolierung des Dipeptides L-Glutaminyl-valinol, H-Gln-Vol

Bei der in Abschn. 7.5.3.4. beschriebenen Kieselgel-Säulenchromatographie zur Isolierung des Prolylpeptides 2 waren aus der Fraktion 20 auch 2 mg eines mit Ninhydrin und Isatin rot angefärbten Peptides isoliert worden (vergl. Abb. 7.5.). Aminosäureanalysen ergaben die Zusammensetzung Glu (1.0), Vol (1.0) und NH_4^+ (1.1). Demnach war bei der Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 bzw. seiner Spaltprodukte auch das C-terminale Dipeptid H-Gln-Vol abgespalten worden. Allerdings nur zu einem sehr geringen Prozentsatz, wie aus der Isolation der relativ großen Mengen der intakten Prolylpeptide hervorging.

An diesem Dipeptid wurde durch massenspektrometrischen Vergleich mit den synthetischen Dipeptiden H-Gln-Vol, H-Glu-Vol und H-Glu(Vol)-NH_2 die α-Verknüpfung des Aminoalkohols festgelegt (vergl. Abschn. 3.4.).

Eine Transpeptidierung bei der Trifluoracetolyse kann aufgrund der milderen Bedingungen als den bei der Veresterung angewandten (1.5 n HCl/Methanol) ausgeschlossen werden (vergl. auch auch Tab. 4.6.).

7.5.3.9. Isolierung eines Heptapeptides (H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-OH) und Charakterisierung weiterer Partialsequenzen

33 mg Trichotoxin A-40 wurden in 3.3 ml Trifluoressigsäure gelöst und im verschlossenen Gefäß 19 h bei 37 °C hydrolysiert. Nach dem Eindampfen, Lösen in CH_2Cl_2, abermaligen Eindampfen und zweimaliger Lyophilisation aus tert.-Butanol unter Zusatz von wenig Wasser wurde über eine Kieselgel-Fertigsäule (Größe B) chromatographiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Bedingt durch Mikroheterogenität des Trichotoxin und weitergehender Acidolyse entstanden hierbei relativ viele schwierig zu trennende Spaltprodukte. Deshalb erwies sich zur Isolierung größerer Fragmente eine dreistündige Trifluoracetolyse als günstiger (vergl. Abschn. 7.5.1.). Deshalb seien nur die Reinigungsoperationen beschrieben, die zur Isolierung der nach dem Prolylpeptid 1 von der Säule eluierten Verbindungen (Fraktion 91-110) führten.

(Die Isolierung von abgespaltenem Ac-Aib-OH ist gesondert in Abschn. 7.5.3.11. geschildert.)
Das Trennschema zu diesem Abschnitt zeigt Abb. 4.9.

Nach Eindampfen obiger Fraktionen und abermaligen Auftropfen zeigte sich, daß insgesamt vier mit Ninhydrin rot bzw. rotorange anfärbbare, nahe beieinander laufende Peptide vorlagen. Zur Isolierung der am stärksten anfärbbaren Verbindung wurde abermals über eine Kieselgel-Fertigsäule (Größe A, Fraktionsvolumen je 3 ml) chromatographiert. Danach waren in den Fraktionen 23-28 im Dünnschichtchromatogramm eine mit Ninhydrin rotorange anfärbenden Hauptkomponente und eine etwas höher laufende Verbindung zu sehen. Deshalb wurde wie zuvor aber bei langsamer gestellten Pumpe chromatographiert und die Fraktionen 27-51 ml vereinigt. Man erhielt 0.8 mg Substanz (Tab. 7.8.).

Tab. 7.8. Aminosäureanalyse des Heptapeptides (vergl. dazu auch Abb. 4.9. und Tab. 4.8.4.).

Heptapeptid (Abb. 4.9.)	R_{Leu}
Fr. 27-51	
Glu 0.91	1
Gly 0.85	1
Ala 0.57	(0.6)
Aib 4.13	4
(Iva) (0.30)	-
Leu 1.00	1
	7

Die GC-MS Analyse dieser 0.8 mg Isolierung ergab eindeutig die Hauptsequenz H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-OH. Eine wahrscheinliche Erklärung für die Aminosäureverhältnisse ergibt sich aus dem Spaltungsverhalten des Trichotoxin bei längerdauernder Trifluoracetolyse unter Berücksichtigung der Sequenzanalogen (vergl. Abb. 4.13.).

Für den Gehalt an Iva ist der schon öfters erwähnte Untergrund verantwortlich, da bei GC-MS kein Iva gefunden wurde (vergl. Abschn. 3.1.2.).

Für die GC-MS Sequenzierung weniger von Bedeutung, jedoch aufgrund der Mikroheterogenität des Trichotoxin nach längerdauernder Trifluoracetolyse zu erwarten, waren die in den Abb. 4.9. und 4.13. gezeigten Verbindungen.

Nochmalige Kieselgel-Säulenchromatographie der vereinigten Fraktionen 16-20 (vergl. Abb. 4.9.) ergab die sich überlappenden, jedoch an einer Komponente jeweils stark angereicherten Fraktionen 21-26 und 27-36. Unter Berücksichtigung dieser Überlappung sowie der für N-terminales Glycin typische rotorangen Anfärbung der Peptide mit Ninhydrin handelte es sich aufgrund der Aminosäureanalyse vermutlich um das Oktapeptid H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Aib-OH und das Undekapeptid H-Gly-Aib-Leu-Aib-Glu-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-OH (vergl. hierzu Trennschema Abb. 4.9. und insbesondere Abb. 4.13.)

Die letzte bei der Isolierung des Heptapeptides überhaupt von der Säule eluierte Verbindung war das Tripeptid H-Ala-Aib-Aib-OH wie durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit Referenzmaterial gezeigt werden konnte (vergl. Abb. 4.9. und Abschn. 7.5.3.10.).

7.5.3.10. Isolierung des Tripeptides H-Ala-Aib-Aib-OH

Zu Beginn der Sequenzierungsarbeiten wurde versucht, Partialsequenzen durch präparative Dünnschichtchromatographie zu isolieren[+]. Als Fließmittel fand das System 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v) Verwendung. Dieses vermochte Ac-Aib-OH ausgezeichnet und die mit Isatin anfärbbaren Prolylpeptide 1 und 2 deutlich zu trennen. Nur teilweise getrennt wurden jedoch die mit Ninhydrin rot anfärbbaren Spaltprodukte. Aus einem Trifluoressigsäurehydrolysat (Acidolysedauer 19 h) wurde jedoch durch präparative Dünnschichtchromatographie eine nahe dem Start verbleibende, mit Ninhydrin rot anfärbende Bande isoliert. Nach weitergehender Reinigung über Sephadex LH-20 (Methanol), Kieselgel-Säulenchromatographie im System X und nochmaliger Säulenchromatographie über Sephadex G-10 (Methanol) wurden 1.7 mg kristallines Peptid isoliert. Eine identische Verbindung wurde auch nach Kieselgel-Säulenchromatographie des in Abschn. 7.5.3.9. beschriebenen Hydrolysates isoliert. Die Substanz wurde dort als letzte, deutlich rot mit Ninhydrin an-

---

[+]Ac-Aib-OH und die Prolylpeptide wurden bei diesen Versuchen erstmals, wenn auch noch in verunreinigter Form, auf diese Weise isoliert und gaben durch ihre Aminosäureanalysen Hinweise auf die Spaltstellen im Trichotoxin. Als wesentlich effektiver als die präparative Dünnschichtchromatographie erwiesen sich dann jedoch die Kieselgel-Säulenchromatographien in Verbindung mit Craig-Verteilungen sowie eine Verkürzung der Acidolysezeit auf 3 h.

färbbare Verbindung und über viele Fraktionen verteilt von der Säule eluiert. Beide Verbindungen zeigten übereinstimmend die Aminosäureverhältnisse Ala (1.0), Aib (2.0) und die GC-MS-Analysen ergaben jeweils die Sequenz H-Ala-Aib-Aib-OH (Tab. 4.8.).
Ein Vergleich mit Abb. 4.13. zeigt, daß dieses Tripeptid vom C-Terminus des Dodekapeptid 2 bzw. Undekapeptid abgespalten wird.

7.5.3.11. Isolierung von Ac-Aib-OH

In den Abschnitten 3.3.2. und 3.3.3. war die Isolierung von aus Trichotoxin A-40 abgespaltenem Ac-Aib-OH geschildert worden. Nachstehend seien Details der Isolierung angegeben:
Bei der in Abschnitt 7.5.3.9. beschriebenen 19 stündigen Trifluoracetolyse des Trichotoxin A-40 wurde Ac-Aib-OH nahezu vollständig vom Peptid abgespalten. Als lipophilstes aller Spaltprodukte wurde Ac-Aib-OH bei der Kieselgel-Säulenchromatographie mit als erstes von der Säule eluiert. Die Ac-Aib-OH enthaltenden Fraktionen aus Abschnitt 7.5.3.9. (vergl. dazu auch Trennschema in Abb. 4.9.) wurden vereinigt, eingedampft und über eine Sephadex G-10 Säule (4 x 440 mm, Methanol) chromatographiert. Auf diese Weise erhaltenes 1.8 mg dünnschichtchromatographisch einheitliches Material wurden in 200 mg Methanol gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Dünnschichtchromatographischer Vergleich mit authentischen Proben zeigte nach 30 min eine vollständige Umwandlung in den entsprechenden Ester. Das so erhaltene Ac-Aib-OMe wurde durch sein Massenspektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum identifiziert (vergl. Abschn. 3.3.2.).

In Abschnitt 3.3.3. war die Isolierung von Ac-Aib-OMe durch Sublimation beschrieben worden. Hierzu wurden 156 mg Trichotoxin A-40 in 8 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und 21 h bei 37 °C im verschlossenen Gefäß hydrolysiert. Nach dem Entfernen der Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer wurde 2 mal aus tert.-Butanol unter Zusatz von Wasser lyophilisiert, der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst und ätherische Diazomethanlösung zugegeben. Nach 30 min wurde die Lösung auf ca. 0.5 ml eingeengt und der Vorgang wiederholt. Die Reaktionslösung wurde im Stickstoffstrom vorsichtig zur Trockne eingeengt, der Rückstand in Dichlormethan gelöst und in eine Mikrosublimationsapparatur (6 x 1 cm) übergeführt. Nach dem Abblasen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurde bei aufgesetztem Kühlfinger und 50 °C/17 Torr sublimiert, wobei sich ein vorsichtiges Rühren mit einem kleinen Magneten als vorteilhaft erwies. Die sich am Kühlfinger abscheidenden weißen Kristallnädelchen wurden in Dichlormethan gelöst und nochmals sublimiert. Man erhielt 3.8 mg Ac-Aib-OMe. Die Substanz wurde durch ihr Massenspektrum charakterisiert (vergl. Abschn. 3.3.3.).

7.6. Derivate des Trichotoxin A-40

7.6.1. Trichotoxin A-40-methylester

30 mg Trichotoxin A-40 wurden in 1.5 ml abs. Methanol gelöst und 4.5 ml ätherische Diazomethanlösung zugetropft. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen und der Rückstand aus tert.-Butanol unter Zusatz von wenig Wasser lyophilisiert. Dünnschichtchromatographisch ist die die vollständige Veresterung zu sehen.
Ausbeute: 30 mg (100 %)
R_F-Werte: Tab. 7.1.

7.6.2. Trichotoxin A-40-amid

4.4 mg Trichotoxin A-40-methylester (7.6.1.) wurden in 400 µl abs. Methanol gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt und NH_3 bis zur Sättigung eingeleitet. Nach 65 h bei 40 °C im verschlossenen Reaktionsgefäß ließ sich dünnschichtchromatographisch die Entstehung von ca. 90 % Amid nachweisen. Nach abermaligem Einleiten von NH_3 und 17 h bei 60 °C war die Umsetzung vollständig. Eine Ammonolyse von Peptidbindungen war unter den Reaktionsbedingungen nicht feststellbar. Das erhaltene Trichotoxin A-40-amid zeigte nach dem Trocknen in P_4O_{10} in allen Dünnschichtsystemen denselben R_F-Wert wie Trichotoxin A-50.
Ausbeute: 4.4 mg (100 %)
R_F-Werte: Tab. 7.1.

7.6.3. Trichotoxin A-40-hydrazid

50 mg Trichotoxin A-40-methylester (7.6.1.) wurden in 500 µl abs. Methanol gelöst und 25 µl wasserfreies Hydrazin zugegeben. Man beließ 63 h bei 40 °C im verschlossenen Reaktionsgefäß, dampfte am Hochvakuum über konz. H_2SO_4 zur Trockne ein und fällte nach dem Lösen in Methanol mit Ether. Die Hydrazinolyse

konnte dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Es bildeten sich keine Nebenprodukte. Charakteristisch ist die blaue Anfärbung des Hydrazids mit Barton's Reagens ($FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$) (107).
Ausbeute: 45 mg (95 % d. Th.)
R_F-Werte: Tab. 7.9.

Tab. 7.9. R_F-Werte des Trichotoxin A-40 und den daraus enthaltenen Methylester, Säureamid und Hydrazid

	Fließmittel	
	VIII	XII
Trichotoxin A-40	0.30	0.28
Methylester	0.68	0.48
Amid	0.59	0.39
Hydrazid	0.59	0.39

Die Aminosäureverhältnisse der Derivate entsprachen dem des Ausgangsmaterials Trichotoxin A-40.

7.7. Synthese von Aminosäurederivaten und Peptiden

7.7.1. Formyl-α-aminoisobuttersäure (For-Aib-OH), Acetyl-α-aminoisobuttersäure (Ac-Aib-OH) und Propionyl-α-aminoisobuttersäure (Prop-Aib-OH)

For-Aib-OH wurde nach (167) hergestellt. Ac-Aib-OH und Prop-Aib-OH wurden in Anlehnung an (168) durch Acylierung von α-Aminoisobuttersäure in einer Mischung aus Pyridin-Wasser 1:1 mit einem 10 %-igen Überschuss an Essigsäureanhydrid bzw. Propionsäureanhydrid hergestellt. Nach 1 h Reaktionsdauer wurden die Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand unter Zusatz von Essigsäure 2 mal lyophilisiert. Durch Umkristallisation aus warmem Ethanol erhielt man Ac-Aib-OH und Prop-Aib-OH in jeweils 95 %-iger Ausbeute. Nachstehend seien zusammengefaßt die Charakterisierung der Verbindungen wiedergegeben.

Tab. 7.10. Charakterisierung N-acylierter α-Aminoisobuttersäuren

Verbindung	Fp. (°C)	Fp. (°C) (Lit.)	Elementaranalysen oben berechnet, unten gefunden % C	% H	% N
For-Aib-OH	142.5	145-147 (167)	45.80 45.46	6.92 7.06	10.68 10.50
Ac-Aib-OH	195	191 (169)	49.65 49.88	7.64 7.79	9.65 9.58
Prop-Aib-OH	153	-	52.83 53.51	8.23 8.56	8.80 8.85

Durch Veresterung mit Diazomethan wurden For-Aib-OH, Ac-Aib-OH und Prob-Aib-OH in ihre Methylester übergeführt und durch ihre Massenspektren charakterisiert (Abschn. 3.3.4.).
R_F-Werte: vergl Tab. 3.1.

^{13}C-NMR-Signale	(ppm) gegen TMS = 0, Lösungsmittel CD_3OD					
	CO		Aib-C_α	Aib-C_β	Prop-C_α	Prop-C_β
For-Aib-OH	177.4 163.1	Aib For	56.7	25.3 (2x)		
Prop-Aib-OH	177.9 176.2	Aib Prop	56.7	25.4 (2x)	29.9	10.1
Ac-Aib-OH	177.7 172.2	Aib Ac	56.5	25.2 (2x)		

7.7.2. L-Valinol und L-Valinol-hydrochlorid

L-Valinol wurde in Analogie zu beschriebenen Verbindungen (74) durch Reduktion von L-Valin mit Diboran (in situ aus $NaBH_4$ und BF_3-Etherat erzeugt) als Öl erhalten.
Sehr rein erhält man den Aminoalkohol, wenn man die auf pH 10 eingestellte Reaktionsmischung einer Wasserdampfdestillation unterwirft, das Destillat mit Salzsäure ansäuert, eindampft und das so erhaltene L-Valinol-hydrochlorid aus Essigester/Ether kristallisiert.

L-Valinol:
Kp.: 98 °/15 Torr; Lit. (170): 96 °/22 Torr

L-Valinol-hydrochlorid:	$C_5H_{14}NOCl$			
berechnet	C 43.01	H 10.10	N 10.03	Cl 25.39
gefunden	C 42.90	H 10.37	N 9.92	Cl 25.18

^{13}C-NMR: Tab. 5.2.

7.7.3. tert.-Butyloxycarbonyl-γ-L-glutamyl-valinol-α-amid, Boc-Glu(Vol)-NH_2

246.3 mg (1 mmol) Boc-L-Glu-NH_2[+] wurde in wenig Dimethylformamid gelöst und mit 10 ml Dichlormethan versetzt. Bei -20 °C fügte man 139 µl)1 mmol) Triethylamin und 99 µl (1 mmol) Chlorkohlensäureethylester zu. Man rührte 15 min bei -15 °C

[+]Die Verbindung war von Herrn E. Pietrzik (171) nach (172) synthetisiert worden. Herrn Kalbacher danke ich für die Überlassung einer Probe.

und gab dann eine auf 0 °C vorgekühlte Lösung von 206 mg (2 mmol) L-Valinol in 1 ml Dichlormethan zu, wobei die Temperatur unter -10 °C gehalten wurde. Nach 10 min bei -10 °C beließ man 12 h bei 0 °C. Dann wurde bis fast zur Trockne eingeengt der Rückstand in 70 ml wassergesättigtem Butanol gelöst und je 3 x mit 15 ml Citronensäure (5 %), $NaHCO_3$ (5 %) und noch 4 x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abdestilliert und der Rückstand in wenig Methanol gelöst. Nach Zugabe von Essigester fiel innerhalb von 12 h bei -15 °C ein weißer, voluminöser Niederschlag aus. Man erhielt eine 1. Fraktion von 50 mg die nach Dünnschicht- und Elementaranalyse völlig rein war. Aus der Mutterlauge konnte durch Zugabe von Petrolether noch weitere 115 mg nicht völlig einheitliches Produkt gewonnen werden.

$C_{15}H_{29}O_5N_3$ (331.4)			
berechnet	C 54.36	H 8.82	N 12.68
gefunden	C 54.02	H 8.78	N 12.48

^{13}C-NMR: Tab. 5.2.

7.7.4. γ-L-Glutamyl-valinol-α-amid-trifluoracetat, H-L-Glu(Vol)-NH_2 x CF_3COOH

47 mg (0.142 mmol) Boc-L-Glu(Vol)-NH_2 wurden in 1 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und nach 7 min am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, nochmals eingedampft, in Methanol gelöst und Ether zugegeben. Es fiel ein schmieriger Niederschlag aus, der bei 0 °C innerhalb von 12 h fest wurde. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der Rückstand am Hochvakuum über P_4O_{10}/KOH getrocknet. Man erhielt einen weißen, stark hygroskopischen Schaum.
^{13}C-NMR: Tab. 5.2.
Massenspektrum: Abb. 3.19.

7.8. Hämolyse (16)

7.8.1. Einstellung der Erythrozytensuspension

Zu 18 ml 3.8 %-iger Natriumcitratlösung wurden 2 ml frisches Venenblut gegeben und anschließend bei 1000 Upm 2 min zentrifugiert um das Plasma abzutrennen. Dann wurde zweimal mit 20 ml des folgenden Puffers gewaschen:
Puffer: 10 mmol/l Phosphat (aus NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4)
154 mmol/l Natriumchlorid (auf pH 7.0 eingestellt)
Zuletzt wird der Rückstand in 18 ml Puffer aufgenommen. 0.2 ml dieser Erythrozytensuspension (nur vorsichtig schütteln!) wurden zu 2.7 ml Puffer gegeben und mit 0.1 ml Methanol versetzt. Zugabe einiger Körnchen Digitonin bewirkte nach einigen Minuten vollständige Lyse. Zu 2 ml dieser klaren Lösung wurde zuerst 0.1 ml einer 1 %-igen $K_3Fe(CN)_6$-Lösung und nach 5 min 0.2 ml einer 0.1 %-igen KCN-Lösung gegeben. Bei 546 nm wurde die Extinktion dieser Lösung gemessen (Zeiss-Photometer M 4 Q III). Als Blindwert diente eine von Anfang an gleichbehandelte Probe ohne Digitonin. War die Extinktion größer als 0.5, so wurde die Erythrozytensuspension so lange mit Puffer verdünnt, bis diese nach der oben angegebenen Vorschrift eine Extinktion von 0.5 ergab. Für jede Messung wurde auch der Blindwert stets von Neuem angesetzt. Die Suspension wurde maximal 1 Tag bei 4 ^{o}C aufbewahrt.

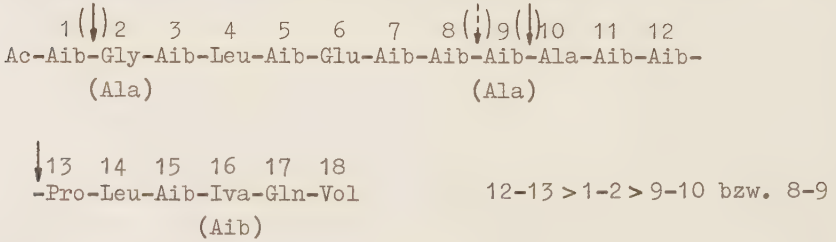
7.8.2. Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven der Hämolyse

Zunächst wurden 0.2 ml einer methanolischen Peptidstammlösung hergestellt, die die doppelte Konzentration gegenüber der Hämolyseanfangskonzentration aufwies. Der Gehalt wurde durch Aminosäureanalyse exakt bestimmt. 0.1 ml dieser Stammlösung wurden zu 2.7 ml Phosphatpuffer gegeben, man erhielt eine klare Lösung. Die restliche Stammlösung wurde zur Herstellung einer Verdünnungsreihe verwendet und analog weiter bearbeitet. Die Peptid-Puffer-Lösungen und die Erythrozytensuspension wurden im

thermostatisierten Wasserbad auf 37 °C erwärmt und je 2.8 ml Peptid-Puffer-Lösung der Verdünnungsreihe mit je 0.2 ml Erythrozytensuspentsion versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 min bei 1000 Upm zentrifugiert und je 2 ml des Überstandes wie oben mit $K_3[Fe(CN)_6]$ und KCN weiterbehandelt. Die Extinktion wurde wieder gegen einen Blindwert aus 2.7 ml Phosphatpuffer, 0.1 ml Methanol und 0.2 ml Erythrozytensuspension gemessen, die wie die Proben behandelt worden war.

8. Zusammenfassung

Trichotoxin ist ein vom Stamm Trichoderma viride NRRL 5242 produziertes Polypeptid-Antibiotikum, welches insbesondere durch die Fähigkeit zur Erzeugung spannungsabhängiger Ionenleitwerte in künstlichen Lipiddoppelmembranen Interesse erlangt.
Die optimierte Isolierung erfolgte aus dem lyophilisierten Mycelium des Pilzes durch Soxhlet-Extraktion mit Dichlormethan. Die Trennung der durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 vorgereinigten Hauptkomponenten A-40 und A-50 gelang durch multiplikative Gegenstromverteilung im Grammaßstab.
In Zusammenarbeit mit Prof. W.A. König und Mitarbeitern, Universität Hamburg, wurde die Sequenz des Trichotoxin A-40 aufgeklärt.
Deren Ermittlung war erschwert durch die Blockierung des N-Terminus mit einem Acetylrest und des C-Terminus mit einem Aminoalkohol. Ferner durch die Mikroheterogenität des Peptides sowie dem hohen Gehalt an α-Aminoisobuttersäure und der dadurch bedingten Resistenz gegen enzymatische Abbaumethoden. Als selektives Spaltreagens wurde jedoch wasserfreie Trifluoressigsäure gefunden. Damit gelang es aus Trichotoxin A-40 bevorzugt drei sequenzanaloge, N-acetylierte Dodekapeptide und zwei Prolylpeptide zu erhalten (Pfeile geben die bevorzugten Spaltstellen an).



Die Trennung dieser Fragmente erfolgte durch Kieselgel-Säulenchromatographie und multiplikativer Gegenstromverteilung. Anschließende GC-MS-Analysen von trifluoracetylierten und veresterten Partialhydrolysaten dieser Fragmente ergaben zusammen

mit Endgruppenbestimmungen deren Sequenz. Als vorher nicht bekannte Komponenten konnten Isovalin und Valinol in Trichotoxin nachgewiesen werden.
Ebenso konnte eine ausgesprochene Mikroheterogenität des Trichotoxin A-40 durch Austausch von Gly/Ala, Aib/Ala und Iva/Aib aufgezeigt werden.
In Zusammenarbeit mit E. Wachter, Universität München, wurde erstmals ein Edman-Abbau an fester Phase Aib-haltiger Partialsequenzen durchgeführt und übereinstimmende Ergebnisse mit der durch GC-MS-Analysen ermittelten Sequenz aus Trichotoxin A-40 erhalten.
Die L-Konfiguration der Aminosäuren und des Aminoalkohols wurde durch Gaschromatographie an chiraler Phase der Pentafluorpropionyl-aminosäure-isopropylester ermittelt. Isovalin wies als einzige Aminosäure im Trichotoxin die D-Konfiguration auf. Die Bestimmung erfolgte durch Bildung der Diastereomeren durch Veresterung mit (+)-3-Methyl-2-butanol, Acylierung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid und Gaschromatographie an einer OV 17 Glaskapillarsäule.
Damit übereinstimmend gelang der Nachweis der D-Konfiguration des Isovalin durch Gaschromatographie des Trifluoracetyl-isovalin-n-propylesters an einer Chirasil-Val Glaskapillarsäule.
Durch Anwendung dieser Methoden konnte gezeigt werden, daß dem Isovalin im Peptidantibiotikum Antiamoebin nicht die bislang zugeschriebene L-Konfiguration sondern die D-Konfiguration zukommt. Desgleichen besitzt Isovalin in den Aib-haltigen Peptidantibiotika Suzukacillin, Samarosporin und Stilbellin die D-Konfiguration.
Die am Trichotoxin aufgezeigten selektiven Spaltungen mit Trifluoressigsäure wurde als ein auf alle Aib-haltigen Peptide anwendbares Prinzip gefunden und konnte auch an synthetischen Modellpeptiden durchgeführt werden.
Die selektive Abspaltung von N-terminalem Ac-Aib-OH wurde auf die natürlichen Analoga des Trichotoxin, Alamethicin und Suzukacillin übertragen. Im Suzukacillin B wurde neben Ac-Aib-OH erstmals Ac-Iva-OH als Bestandteil nachgewiesen.

Die verwendeten Spaltungs- und Isolierungsmethoden erlaubten die präparative Gewinnung definierter Partialsequenzen des Trichotoxin A-40 für spektroskopische Untersuchungen.
Durch CD-Messungen konnte gezeigt werden, daß der etwa 11 Aminosäuren umfassende N-Terminus den helikalen Teil des Moleküls bildet und der mit Prolin beginnende C-Terminus in einer überwiegend ungeordneten Struktur vorliegt.
Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Breitmaier, Universität Bonn, durch ^{13}C-NMR-Untersuchungen des Trichotoxin A-40 und daraus isolierter Partialsequenzen bestätigt.
Derivate des Trichotoxin A-40 und isolierte Partialsequenzen wurden auf ihre membranmodifizierenden Wirkungen untersucht. Dabei zeigten aus dem Trichotoxin A-40 isolierte Dodekapeptide und Prolylhexapeptide keine hämolytischen Aktivitäten mehr.

In Zusammenarbeit mit D. G. Boheim, Universität Bochum, wurde gezeigt, daß durch multiplikative Gegenstromverteilung gereinigtes Trichotoxin A-40 in künstlichen Lipiddoppelschichtmembranen ionenleitende Strukturen induziert. Deren isoliertes Verhalten war innerhalb der Zeitauflösung der experimentellen Apparatur nicht beobachtbar, die Spannungsabhängigkeit jedoch mit der des Alamethicin vergleichbar.
Diese spannungsabhängige Ionenleitung in Form sogenannter Bursts läßt sich durch Zugabe von Peptid-Fragmenten stabilisieren.

9. Literaturverzeichnis

1) Ooka, T., Shimojima, Y., Akimoto, T., Takeda, I., Senoh, S. und Abe, J. (1966) Agr. Biol. Chem. 30, 700-702

2) Japanisches Patent Nr. 13795 (1965); Chem. Abstr. 63, 17092 c

3) Ooka, T. und Takeda, I. (1972) Agr. Biol. Chem. 36, 112-119

4) Ooka, T. und Takeda, I. (1974) Agr. Biol. Chem. 38, 19-27

5) Jung, G., König, W.A., Leibfritz, D., Ooka, T., Janko, K. und Boheim, G. (1976) Biochim. Biophys. Acta 433, 164-181

6) Japanisches Patent Nr. 750517 (1975); Chem. Abstr. 83, 37917

7) Meyer, P. und Reusser, F. (1967) Experientia 23, 85-86

8) Französisches Patent Nr. 1511185 (1968) Chem. Abstr. 70, 95471

9) McMullen, A.I. (1970) Biochem. J. 119, 10 P-11 P

10) Payne, J.W., Jakes, R. und Hartley, B.S. (1970) Biochem. J. 117, 757-766

11) Ovchinnikov, Y.A., Kiryshkin, A.A. und Kozhevnikova, I.V. (1971) Zhurnal Obshchei Khimii 41, 2085-2099; J. Gen. Chem. USSR (1971) 41, 2105-2116

12) Martin, D.R. und Williams, R.J.P. (1975) Biochem. Soc. Trans., Proc. 533 rd Meeting, Vol. 3, 166-167

13) Martin, D.R. und Williams, R.J.P. (1976) Biochem. J. 153, 181-190

14) Jung, G., Dubischar, N., Leibfritz, D., Ottnad, M., Probst Probst, H. und Stumpf, C. (1975) in Peptides 1974, Proceedings of the 13 th European Peptide Symposium, Wolmar, Y., Ed. Wiley, New York, N.Y., (1975) pp. 345-354

15) Jung, G., Dubischar, N., Irmscher, G., Mayr, W. und Oekonomopulos, R. (1977) Chemiker Ztg. 101, 196-201

16) Irmscher, G. (1977) Dissertation, Universität Tübingen

17) Jung, G. und Irmscher, G. (1977) Eur. J. Biochem. 80, 165-174

18) Pandey, R.C., Cook, J.C. und Rinehart, K.L. (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99, 8469-8483

19) Meena, D., Laddu, A.R. und Saryal, R.K. (1967) Current. Sci. 36, 347-348

20) Französisches Patent Nr. 1460217 (1966), Chem. Abstr. 67, 107379

21) Thirumalachar, M.J., Rhadhakrishnan, C.V. und Vores, A.P.B. (1966) Hindustan Antibiot. Bull. 8, 201-204

22) Thirumalachar, M.J. (1968) Hindustan Antibiot. Bull. 10, 287-289

23) Deshmukh, P.V. und Vaidya, M.G. (1968) Nature 217, 849

24) Vaidya, M.G., Deshmukh, P.V. and Chari, S.N. (1968) Hindustan Antibiot. Bull. 11, 81-89

25) Rinehart, K.L., Meng, H., Olson, K.L., Cook, J.C. und Pandey, R.C. (1977) Nature 269, 832-833

26) Pandey, R.C., Meng, H., Cook, J.C. und Rinehart, K.L. (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99, 5203-5205

27) Pandey, R.C., Cook, J.C. und Rinehart, K.L. (1978) J. Antibiot. 31, 241-243

28) Werner, G. (1977) Diplomarbeit, Universität Tübingen

29) Sasaki, K., Minato, H., Katagiri, K., Hayakawa, S. und Matsushima, T. (1971) J. Antibiot. 24, 67-68

30) Hou, C.T., Ciegler, A. und Hesseltine, C.W. (1972) Appl. Microbiol. 23, 183-185

31) Argoudelis, A.D. und Johnson, L.E. (1974) J.Antibiot. 27, 274-282

32) Pandey, R.C., Cook, J.C. und Rinehart, K.L. (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99, 5205-5206

33) Argoudelis, A.D., Dietz, A. und Johnson, L.E. (1974) J. Antibiot. 27, 321-328

34) Inoue, N., Inoue, A., Furukawa, M. und Kanda, N. (1976) J. Antibiot. 29, 618-622

35) Japanisches Patent Nr. 7336200 (1973); Chem. Abstr. 79, 35134

36) Dennis, C. und Webster, J. (1971) Trans. Br. mycol. Soc. 57, 25-39

37) Irmscher, G., Bovermann, G., Boheim, G. und Jung, G. (1978) Biochim. Biophys. Acta 507, 470-484

38) Jung, G., Brückner, H. und Oertel, B. (1978) Symp. Chem. of Peptides and Proteins, Grainau (Germany) 1978, Abstr. pp. 165-166

39) Oertel, B. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

40) Brückner, H., König, W.A., Greiner, M. und Jung, G. (1979) Angew. Chem. 91, 508-509; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 476-477

41) Brückner, H., Jung, G., König, W.A. und Wachter, E. (1979) in Peptides, Proc. 6 th Am. Peptides Symp., 17.-22. Juni 1979, Washington, im Druck

42) König, W.A., Krohn, H., Greiner, M., Brückner,H. und Jung, G. (1979) Adv. Mass Spec. 8, im Druck

43) Brückner, H., König, W.A., Wachter, E. und Jung, G. (1979) Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 26.-28. September 1979, Tübingen; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 360, 1135-1136

44) Mueller, P. und Rudin, D.O. (1968), Nature 217, 713-719

45) Boheim, G., Janko, K., Leibfritz, D., Ooka, T., König, W.A. und Jung, G. (1976) Biochim. Biophys. Acta 433, 182-199

46) Boheim, G., Irmscher, G. und Jung, G. (1978) Biochim. Biophys. Acta 507, 485-506

47) Pinkerton, M., Steinrauf, L. und Dawkins, P. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 512

48) Urry, D.W. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 672

49) Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 1014-1018

50) Kenner, G.W. und Sheppard, R.C. (1958) Nature 181, 48

51) Closse, A. und Huguenin, R. (1974) Helv. Chim. Acta 57, 60-61

52) Jung, G., Leibfritz, D., Ottnad, M., Dubischar, N. und Probst, H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355,1213

53) Stumpf, C. (1973) Diplomarbeit, Universität Tübingen

54) Lau, A.L.Y. und Chan, S.I. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2170-2174

55) Bonnafous, J.-C., Dornand, J. und Mani, J.-C. (1979) Bioch. Biophys. Res. Comm. 86, 536-544

56) Bessler, W.G., Ottenbreit, B., Irmscher, G. und Jung, G. (1979) Bioch. Biophys. Res. Comm. 87, 99-105

57) Famaey, J.P. und Whitehouse, M.W. (1975) Agents Actions 5, 133-136

58) Besch, H.R., Jones, L.R., Fleming, J.W. und Watanabe, A.M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7905-7908

59) Pressman, B.C. (1968) Fed. Proc. 27, 1283-1288

60) Melling, J. und McMullen, A.I. (1975) ISC-IAMS Proc., Science Council of Japan 5, 446-452

61) Brückner, H. und Jung, G. (1980) Chromatographia, im Druck

62) Brückner, H. und Jung, G., in Bearbeitung

63) Reusser, F. (1967) J. Biol. Chem. 242, 243-247

64) Kleinkauf, H. und Rindfleisch, H. (1975) Acta Microbiol. Acad. Sci. hung. 22, 411-418

65) Rindfleisch, H. und Kleinkauf, H. (1976) FEBS Lett. 62, 276-280

66) Mohr, H. (1977) Dissertation, Universität Berlin

67) Kleinkauf, H. und Koischwitz, H. (1978) Progr. Mol. Subcell. Biol. 6, 59-112

68) Mohr, H. und Kleinkauf, H. (1979) Bioch. Biophys. Res. Commun., im Druck

69) Craig, L.C. (1960) in A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry, Alexander, P. und Block, R.J., Eds., Vol. 1, Pergamon Press, Oxford, p. 121

70) Hecker, E. (1955) Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

71) Gil-Av, E., Feibush, B. und Charles-Sigler, R. (1967) in Gas Chromatography 1966, Littlewood, A.B., Ed., Institute of Petroleum, London, pp. 227-239

72) Frank, H., Nicholson, G.J. und Bayer, E. (1977) J. Chrom. Sci. 15, 174-176

73) Frank, H., Nicholson, G.J. und Bayer, E. (1978) J. Chromatogr. 146, 197-206

74) Anhoury, M.-L., Arickx, M., Crooy, P., De Neys, R. und Eliaers, J. (1974) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 191-192

75) König, W.A. und Nicholson, G.J. (1975), Anal. Chem. 47, 951-952

76) Kruse, K., Francke, W. und König, W.A. (1979) J. Chromatogr., im Druck

77) Greenstein, J.P. und Winitz, M. (1961) Chemistry of the amino acids, Vol. 1, Wiley, New York, London and Sidney, pp. 83-88

78) Fu, S.-C.J. und Birnbaum, S. M. (1953) J. Amer. Chem. Soc. 75, 918-920

79) Yamada, S. und Achiwa, K. (1964) Chem. Pharm. Bull. 12, 1525-1529

80) Terashima, S., Achiwa, K. und Yamada, S. (1965) Chem. Pharm. Bull. 13, 1399-1407

81) Baker, C.G., Fu, S.-C.J., Sanford, M., Birnbaum, S.M., Sober, H.A. und Greenstein, J.P. (1952), J. Am. Chem. Soc. 74, 4701-4702

82) Frydman, N., Tamari, T., Feibush, B. und Gil-Av, E. (1972) Proc. Israel Chem. Soc. 42 d Meeting, Dec. 1972, p. 11

83) Turk, J., Panse, G.T. und Marshall, G.R. (1975) J. Org. Chem. 40, 953-955

84) Fischer, E. und von Grävenitz, R. (1914), Ann. 406, 1-11

85) Japanisches Patent Nr. 75116418 (1975); Chem. Abstr. 84, 59998

86) Davankov, V.A., Rogozhin, S.V., Yamskov, I.A. und Kabanov, Kabanov, V.P. (1971) Ser. Khim. 10, 2327-9; Chem. Abstr. 76, 60022

87) Kolb, M. und Barth, J. (1979) Tetrahedron Letters 32, 2999-3002

88) Pollock, G.E. (1972) Anal. Chem. 44, 2368-2372

89) Flores, J.J., Bonner, W.A. und van Dort, M.A. (1977) J. Chrom. 132, 152-154

90) Bucherer, H.Th. und Lieb, V.A. (1934) J. Prak. Chem. 141, 5-43

91) König, W.A., Rahn, W. und Eyem, J. (1977) J. Chrom. 133, 141-146

92) Brückner, H., Nicholson, G.J.,Jung, G., Kruse, K. und König, W.A. (1980) Chromatographia, eingereicht

93) Stahl, E. (Ed.) (1967) Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl.

94) Sarges, R. und Witkop, B. (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87, 2011

95) Jentsch, J. (1969) Z. Naturforsch. Teil B, 24, 33-35

96) Heyns, K. und Grützmacher, H.-F. (1961) Z. Naturforsch. 16 b, 293-298

97) Andersson, C.-O., Ryhage, R. und Stenhagen, E. (1962) Arkiv för Kemie 19, 417-434

98) Biemann, K., Seibl, J. und Gapp, F. (1961) J. Amer. Chem. Soc. 83, 3795-3804

99) Melling, J. und McMullen, A.J. (1975), ISC-IAMS Proc. 5, 446-452

100) Nitecki, D.E. und Goodman, J.W. (1971) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein, B. (Ed.), Vol. 1, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 87-126

101) Jentsch, J. (1972) Liebigs Ann. Chem. 757, 193-195

102) Ressler, C. und Ratzkin, H. (1961) J. Organ. Chem. 26, 3356-3360

103) Edman, P. und Henschen, A. (1975) in Protein Sequence Determination, Needleman, S.B., Ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 232-279

104) Sanger, F. und Tuppy, H. (1951) Biochem. J. 49, 463

105) Hartley, B.S. und Massey, V. (1956) Biochim. Biophys. Acta 21, 58-70

106) Niu, C.-I. und Fraenkel-Conrat, H. (1955) J. Amer. Chem. Soc. 77, 5882-5885

107) Pataki, G. (1966) Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, De Gruyter & Co, Berlin

108) Randerath, K. (1972) Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 2. Aufl.

109) Von Arx, E., Faupel, M. und Brugger, M. (1976) J. Chromatogr. 120, 224-228

110) Oekonomopulos, R. (1978) Dissertation, Universität Tübingen

111) Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1979) Liebigs Ann. Chem. 1151-1172

112) McFadden, W. (1973) Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis, Wiley, New York

113) Bayer, E., Gugel, K.H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W.A. und Zähner, H. (1972) Helv. Chim. Acta 55, 224

114) König, W.A., Engelfried, C., Hagenmaier, H. und Kreifel, H. (1976) Liebigs Ann. Chem. 2011

115) Weygand, F., Prox, A., Fessel, H.H. und Kun Sun, K. (1965) Z. Naturforsch. 206, 1169

116) Nau, H. (1976) Angew. Chemie 88, 74-86

117) Richter, W.J. und Schwarz, H. (1978) Angew. Chemie 90, 449-469

118) Gray, W.R. und Hartley, B.S. (1963) Biochem. J. 89, 379

119) Gray, W.R. (1967) in Methods of Enzymology, Vol. XI, Hirs, C.H.W., Ed., Academie Press, New York, pp. 469-475

120) Laursen, R.A. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 89

121) Laursen, R., Ed., (1975) Solid Phase Methods in Protein Sequenze Analysis, Pierce Chemical Company, Pub., Rockford, Illinois

122) Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H. und Otto, J. (1973), FEBS Letters, 97-102

123) Machleidt, W. und Wachter, E. (1977) in Methodes in Enzymology, Vol. XLVII, Hirs, C.H.W., Ed., Academi Press, New York, pp. 263-277

124) Wachter, E. und Werhahn, R. (1979) Analyt. Chem. 97, 56-64

125) Perham, R.H., Ed., (1975) Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis, Academic Press, London, New York, San Francisco

126) Djerassi, C. (1960) Optical Rotatory Dispersion. Applications to Organic Chemistry, McGraw-Hill Publ., New York, Toronto, London

127) Crabbé, P. (1965) Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Holden Day, San Francisco

128) Crabbé, P. (1972) ORD and CD in Chemistry and Biochemistry, Academie Press, New York

129) Jirgensons, B. (1973) Optical Activity of Proteins and other Macromolecules, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

130) Greefield, N., Davidson, B. und Fasman, G.D. (1967) Biochemistry 6, 1630

131) McMullen, A.I., Marlborough, D.I. und Bayley, P.M. (1971) FEBS Lett. 16, 278

132) Jung, G., Dubischar, N. und Leibfritz, D. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 395-409

133) Leibfritz, D., Mayr, W., Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1978) Tetrahedron 34, 2045-2050

134) Mayr, W. (1975) Diplomarbeit, Universität Tübingen

135) Mayr, R., Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1979) Biopolymers 18, 425-450

136) Mayr, W. (1979) Dissertation, Universität Tübingen

137) Schmitt, H. (1979) Diplomarbeit, Universität Tübingen

138) Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1980) Biopolymers, im Druck

139) Jung, G., Brückner, H., Oekonomopulos, R., Boheim, G., Breitmaier, E. und König, W.A. (1979) in Peptides, Proc. 6 th Am. Peptides Symp., 17.-22. Juni 1979, Washington, im Druck

140) Jung, G. und Brückner, H. (1979), Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 26.-28. September 1979, Tübingen; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1159-1160

141) Mayr, W., Brückner, H., Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1979), Herbstagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 26.-28. September 1979, Tübingen; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1176-1177

142) Schulz, G.E. und Schirmer, R.H. (1979), Principles of Protein Strukture, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

143) Burgess, A.W. and Leach, S.J. (1973) Biopolymers 12, 2599-2605

144) Malcolm, B.R. (1977) Biopolymers 16, 2591-2592

145) Smith, G.D., Duax, W.L., Kendrick, N.E., Marshall, G.R. and Mathews, F.S. (1977) in Peptides, Goodman, M. and Meienhofer, J., Eds., Wiley, New York, p. 277-279

146) Shamala, N., Nagaraj, R. and Balaram, P. (1978) J.C.S. Chem. Comm. 996-997

147) Shamala, N., Nagaraj, R. and Balaram, P. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 292-298

148) Nagaraj, R., Shamala, N. and Balaram, P. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 16-20

149) Venkatachalapathi, Y.U. und Balaram, P. (1979) Nature 281, 83-84

150) Venkataram Prasad, B.V., Shamala, N., Nagaraj, R., Chandrasekaran, R. und Balaram, P. (1979) Biopolymers 18, 1635-1646

151) Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1975) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 270, 433-447

152) Boheim, G. und Hall, J.E. (1975) Biochim. et Biophys. Acta 389, 436-443

153) Mueller, P. (1975) Ann. New York Acad. Sci. 264, 247-264

154) Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1976) Biochim. et Biophys. Acta 436, 541-556

155) Boheim, G. und Kolb, H.A. (1978) J. Membrane Biol. 38, 99-150

156) Montal, M. und Mueller, P. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci., USA 69, 3561-3566

157) Brückner, H., Jung, G., Hanke, W. und Boheim, G. (1979) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, 1.-3. Oktober 1979, Konstanz, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 55

158) Dubischar, N. (1976), Dissertation, The University of Toledo, USA

159) Venkatachalam, C.M. (1968) Biopolymers 6, 1425-1436

160) Brückner, H. und Jung, G. (1980) Liebigs Ann. Chem., im Druck

161) Sieber, P. und Iselin, B. (1969) Helv. Chim. Acta 52, 1525-1531

162) Französisches Patent Nr. 1511185 (1968) Chem. Abstr. 70, 95471

163) Raistrick, H. und Rudmann, P. (1956) Biochem. J. 63, 395-406

164) Riddick, J.A. und Burger, W.A. (1970) Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification, Wiley-Interscience, New York

165) Narita, K., Matsvo, H., Nakajima, T. (1975) in Protein Sequence Determination, Needleman, S.B., Ed., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 54-55

166) Schulten, H.R. (1977) in Methods of Biochemical Analysis, Glick, D., Ed., Vol. 24, Wiley Interscience, New York

167) Leplawy, M.T., Jones, D.S., Kenner, G.W. und Sheppard, R.C. (1960) Tetrahedron 11, 39-51

168) Levene, P.A. und Steiger, R.E. (1928) J. Biol. Chem. 79, 95-103

169) Bell, E.A. (1958) J. Chem. Soc. 2423-2425

170) Rubinstein, H., Feibush, B. und Gil-Av, E. (1973) J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 2094-2097

171) Pietrzik, E. (1977) Dissertation, Universität Tübingen

172) Ressler, C. (1960) J. Amer. Chem. Soc. 82, 1641

Danksagung

Neben den an der betreffenden Stelle im Text bereits erwähnten Personen, möchte ich noch besonders folgenden Mitarbeitern und Kollegen des Chemischen Institut meinen herzlichen Dank für ihre Unterstützung aussprechen: Fr. Oehling und Frl. S. Naumann (Aminosäureanalysen), Fr. I. Oekonomopulos (techn. Assistenz), Fr. Stegmann (Fotoarbeiten) sowie den Herren H. Bartholomä (MS, FDMS) und G. J. Nicholson (GC, GC-MS).
Unterstützung durch Überlassung von Präparateproben erhielt ich auch von meinen Kollegen den Herren W. Mayr, H. Schmitt, H. Kalbacher und von G. Bovermann (NMR-Spektroskopie).

Ganz besonderer Dank gebührt aber meiner Frau Marita für die Maschinenschrift der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

Am 28. Dezember 1944 wurde ich als Sohn der Eheleute Otto Brückner und Lore Brückner, geb. Seybold, in Göppingen/Baden-Württemberg geboren. Nach der Grundschulausbildung in Göppingen besuchte ich ab 1955 die Mittelschulen in Göppingen und Reutlingen, wo ich 1962 die Prüfung der Mittleren Reife ablegte.

Von April 1962 bis März 1963 war ich als Chemielaboranten-Lehrling am Chemischen Landesuntersuchungsamt Reutlingen tätig; ab April 1963 besuchte ich die Fachschule für Chemotechniker an der Kerschensteinerschule in Stuttgart-Feuerbach und legte 1965 die staatliche Prüfung als Chemotechniker ab.

Nach einjähriger Beschäftigung am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen besuchte ich ab April 1966 bis Juni 1968 das Technikum für Chemie und Physik Prof. Dr. Grübler, Isny/Allgäu und erwarb den Titel eines staatlich geprüften Ingenieurs der Fachrichtung Chemie.

Von August 1968 bis August 1971 arbeitete ich auf dem Gebiet der Peptidforschung bei der Ciba-Geigy AG in Basel/Schweiz.

Im Oktober 1971 immatrikulierte ich mich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen für das Fach Chemie. Im Oktober 1973 bestand ich die Vordiplomprüfung und im Februar 1976 den mündlichen Teil der Diplomprüfung in Chemie. Anschließend fertigte ich am Organischen Chemischen Institut der Universität Tübingen die Diplomarbeit an und begann im März 1977 unter Betreuung von Prof. Dr. Günther Jung an der vorliegenden Dissertation mit dem Thema "Trichotoxin A-40: Isolierung, Sequenzierung und Konformationsuntersuchungen eines membranmodifizierenden Polypeptid-Antibiotikums" dessen experimenteller Teil im Juli 1979 abgeschlossen wurde.

Seit 1968 bin ich mit Marita Brückner, geb. Land, verheiratet.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich: E. Bayer, W. Braun G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Kraus, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Pausewang, W. Rüdorff, F.F. Seelig, W. Voelter, W. Zeil

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Forststr. 58 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711 / 61 06 41 - 42

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Forststr. 58 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711 / 61 06 41 - 42